



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การควบคุมการเพี่ยวของดอกปทุมมาโดยการใช้เทคนิคแอนติเซน  
และการประยุกต์ใช้ไออ้อนบีม

โดย ดร. สุภัค มหัทธนพรรค และคณะ

ស័ព្ទលោកលេខទី MRG 5380221

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

## โครงการ การควบคุมการเที่ยวของดอกปทุมมาโดยการใช้เทคโนโลยีและนวัตกรรม

## ជំនួយ

# สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยพะเยา

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG 5380221

ชื่อโครงการ: การควบคุมการเพี่ยวของดอกปทุมมาโดยการใช้เทคนิคแอนติเซนและการประยุกต์ใช้ไอโอนบีม

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน: ดร. สุกัค มหัทธนพรรค มหาวิทยาลัยพะเยา

อีเมล์: burinka@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

### บทคัดย่อ:

งานวิจัยนี้ได้รายงานถึงการกระตุ้นให้เกิดการส่งถ่ายยีนในพืชโดยใช้ไอโอนบีมพลังงานต่ำ โดยมีวัตถุประสงค์ในของการวิจัยคือการยับยั้งการแสดงออกของยีนเอชีซีชีนเทศในดอกปทุมมา โดยการแยกชิ้นส่วนของชีดีเอ็นเอที่เข้ารหัสยีนเอชีซีชีนเทศและเอชีซีอักษรชีเดส จากดอกปทุมมาจากนั้นนำมาศึกษาการแสดงออกของยีนโดยวิธี Northern blot และ RT-PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนนั้น ผลการวิจัยแสดงว่า yin Ca-ACSI และ Ca-ACOI ตรวจพบในกลีบเทียนและดอกปทุมมาและมีการแสดงออกอย่างชัดเจนในระหว่างหลังการเก็บเกี่ยว จากนั้น yin Ca-ACSI ถูกนำไปแทรกในส่วนของดีเอ็นเอพาหะคือพลาสมิด pBI121 โดยให้ชื่อว่า pBI121-Ca-ACSI และนำไปส่งถ่ายเข้าสู่พืชตัวอย่างคือดอกแรมบูรา (*Torenia fournieri*) โดยการประยุกต์ใช้ไอโอนบีมพลังงานต่ำที่พลังงาน 28–50 keV ที่ความถี่  $10^{14}$ – $10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup> หลังจากการส่งถ่ายยีนได้ทำการตรวจสอบผลโดยเทคนิค PCR และการตรวจการแสดงออกของยีน GUS พบว่าการใช้ไอโอนบีมพลังงานต่ำมีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนได้ นอกจากนี้ได้นำพืชที่ทำการส่งถ่ายแล้วไปตรวจสอบการเสื่อมสภาพของดอก ซึ่งผลการวิจัยแสดงต้นที่ได้รับการส่งถ่ายยีนสามารถยืดอายุของดอกได้โดยแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์เดิม

คำหลัก : ปทุมมา เอชีซีชีนเทศ ไอโอนบีม

## Abstract

---

**Project Code :** MRG 5380221

**Project Title :** Control of flower Senescence-Association on Curcuma alismatifolia Gagnep. by using antisense technique and ionbeam application

**Investigator :** Dr. Supuk Mahadtanapuk

**E-mail Address :** burinka@hotmail.com

**Project Period :** 2 years

### **Abstract:**

In this report we present a novel method to induce gene transfer in plant using a low-energy ion beam. Aim of this work was to suppress an expression of ACC synthase gene in Siam tulip, Curcuma alismatifolia Gagnep. An cDNA fragment encoding ACC synthase from *C. alismatifolia* Gagnep. was isolated and its expression was analyzed. To determine the expression of pCa-ACSI , the northern blot analysis and RT-PCR was used for gene analysis by specific primer. The result showed that the Ca-ACSI and Ca-ACOI genes were detected in bract and flower of curcuma. The highest expression of genes was observed at postharvesting. after flower was cut. The Ca-ACSI was subcloned pBI121 resulting in pBI121-Ca-ACSI , then transformed into model plant (*Torenia fournieri*) by application low-energy ion beam at an energy of 28–50 keV with a fluence range of  $10^{14}$ – $10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>. After this treatment, the transgenic plantlets were confirmed by PCR analysis and a histochemical GUS assay. Highly efficient of transformant tissue was showed as a method to plant transform with application low-energy ion beam bombardment. Moreover the transgenic plants were selected randomly and flower senescence was observed during natural senescence. Antisense gene-introduced transgenic plants showed statistic significantly greater longevity compare with wile type.

**Keywords :** Curcuma, ACC synthase, ion beam

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้รายงานถึงการกระตุ้นให้เกิดการส่งถ่ายยีนในพืชโดยใช้ออนบีมพลังงานต่ำ โดยมีวัตถุประสงค์ในของการวิจัยคือการยับยั้งการแสดงออกของยีนเอชีซีชินເກສในดอกปทุมมา โดยการแยกชิ้นส่วนของซีดีเอ็นเอที่เข้ารหัสยีนเอชีซีชินເກສและเอชีซีออกซิເດສ จากดอกปทุมมาจากนั้นนำมาศึกษาการแสดงออกของยีนโดยวิธี Northern blot และ RT-PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนนั้น ผลการวิจัยแสดงว่า yin Ca-ACSI และ Ca-ACOI ตรวจพบในกลีบเทียมและดอกของดอกปทุมมาและมีการแสดงออกอย่างชัดเจนในระหว่างหลังการเก็บเกี่ยว จากนั้น yin Ca-ACSI ถูกนำไปแทรกในส่วนของดีเอ็นเอพาหะคือพลาสมิด pBI121 โดยให้ชื่อว่า pBI121-Ca-ACSI และนำไปส่งถ่ายเข้าสู่พืชตัวอย่างคือดอกแพร่เมืองบุรา (*Torenia fournieri*) โดยการประยุกต์ใช้ออนบีมพลังงานต่ำที่พลังงาน 28–50 keV ที่ความถี่  $10^{14}$ – $10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup> หลังจากการส่งถ่ายยีนได้ทำการตรวจสอบโดยเทคนิค PCR และการตรวจการแสดงออกของยีน GUS พบว่าการใช้ออนบีมพลังงานต่ำมีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนได้ นอกจากนี้ได้นำพืชที่ทำการส่งถ่ายแล้วไปตรวจสอบการเสื่อมสภาพของดอก ซึ่งผลการวิจัยแสดงต้นที่ได้รับการส่งถ่ายยีนสามารถยืดอายุของดอกได้โดยแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์เดิม

In this report we present a novel method to induce gene transfer in plant using a low-energy ion beam. Aim of this work was to suppress an expression of ACC synthase gene in Siam tulip, *Curcuma alismatifolia* Gagnep. An cDNA fragment encoding ACC synthase from *C. alismatifolia* Gagnep. was isolated and its expression was analyzed. To determine the expression of pCa-ACSI, the northern blot analysis and RT-PCR was used for gene analysis by specific primer. The result showed that the Ca-ACSI and Ca-ACOI genes were detected in bract and flower of curcuma. The highest expression of genes was observed at postharvesting. after flower was cut. The Ca-ACSI was subcloned pBI121 resulting in pBI121-Ca-ACSI, then transformed into model plant (*Torenia fournieri*) by application low-energy ion beam at an energy of 28–50 keV with a fluence range of  $10^{14}$ – $10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>. After this treatment, the transgenic plantlets were confirmed by PCR analysis and a histochemical GUS assay. Highly efficient of transformant tissue was showed as a method to plant transform with application low-energy ion beam bombardment. Moreover the transgenic plants were selected randomly and flower senescence was observed during natural senescence. Antisense gene-introduced transgenic plants showed statistic significantly greater longevity compare with wile type.

**Keywords :** *Curcuma*, ACC synthase, ion beam

## สรุปโครงการ (Executive summary)

พืชสกุลปทุมมาจัดอยู่ในพืชกลุ่ม Zingiberaceae ซึ่งมีประมาณ 70 ชนิด พบ อยู่ตามพื้นที่เขตร้อนเช่น อินเดีย พม่า ไทย และมาเลเซีย ในประเทศไทยพืชสกุลปทุมมา เป็นไม้ดอกที่มีช่วงการออกดอกตั้งแต่ช่วงฤดูแล้งประมาณเดือนเมษายนจนถึงช่วงฤดูฝนประมาณเดือน พฤษภาคมถึงกันยายน หลังจากนั้นจึงเริ่มเข้าสู่การพักหัว ในสมัยก่อนพืชสกุลปทุมมาถูกนำมาใช้เพื่อ เป็นผักและยา แต่ในปัจจุบันพืชสกุลปทุมมาเป็นพืชที่มีความสำคัญมากในธุรกิจประเทศไทยไม้ดอกไม้ ประดับ อันเนื่องมาจากปทุมมา มีความหลากหลายในรูปร่างและสีสันของดอกจึงกล้ายเป็นพืชที่นิยมใช้ เป็นไม้กระถาง ไม้ตัดดอกและไม้ประดับในแปลงทั้งในและต่างประเทศ ทำให้ได้รับการส่งเสริมให้เป็นพืช เศรษฐกิจที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการส่งออกหัวพันธุ์เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จะเห็นได้ว่าจากปี 2536 มีการส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมาปริมาณ 131,290 หัว เป็นมูลค่า 2,471,360 บาท และเพิ่มขึ้น ในปี 2539 ปริมาณหัวพันธุ์ส่งออกเป็น 1,308,534 หัว มูลค่า 1,769,111 บาท ทำให้ประเทศไทย เป็นประเทศหลักในการผลิตและส่งออกพืชสกุลปทุมมาจนได้ชื่อของปทุมมาว่าเป็น Siam Tulip ของ South East Asia ซึ่งประเทศไทยนำเข้ามีประเทศไทยหลัก ๆ คือ ญี่ปุ่น ฮอลแลนด์ และอเมริกา ในการ ส่งออกปทุมมาสามารถส่งออกได้ 2 รูปแบบคือ ในรูปของหัวพันธุ์ และ ไม้ตัดดอก

ซึ่งในการผลิตไม้ตัดดอกยังมีปัญหารื่องอายุหลังเก็บเกี่ยวของดอกอันเนื่องมาจากการทำงาน ของยีนในกระบวนการสร้างเยอทิลิน ทำให้ตัดดอกปทุมมาเกิดการเสื่อมสภาพ ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด ปัจจุบันเทคโนโลยีทางพันธุ์วิเคราะห์มีการตัดต่อพันธุกรรมเพื่อให้ตัดดอกไม้มีอายุดอกหลังการตัดนานขึ้น ซึ่ง ทำกันอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ ในประเทศไทยการศึกษาเรื่องยีนที่เกี่ยวกับการเสื่อมสภาพของ ดอกปทุมมาบังมีน้อยงานวิจัยนี้จึงได้ทำการแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพในดอกปทุมมาเพื่อ นำไปประยุกต์ใช้ในการยืดอายุดอกหลังการเก็บเกี่ยว อีกทั้งเป็นการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีใหม่คือการ ใช้ลำไกอ่อนเพลิงงานต่ำในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชตัวอย่าง และพบว่าสามารถประยุกต์ใช้ในการส่งถ่าย ยีนดังกล่าวได้สำเร็จ นอกจากนี้การส่งถ่ายยีนดังกล่าวบังสารถยืดอายุดอกของพืชตัวอย่างได้เมื่อ เปรียบเทียบกับพืชชุดควบคุม งานวิจัยดังกล่าวจะได้นำทางในการปรับปรุงพันธุ์ดอกปทุมมาใน อนาคตโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพซึ่งจะทำให้ยั่งนานาเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ได้

## วัตถุประสงค์

1. ได้ชิ้นส่วนยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตเออทีลีนคือ ACC synthase หรือ ACC oxidase ของปัทุมมา
2. ทราบลำดับเบสของยีนและการแสดงออกของยีน ACC synthase หรือ ACC oxidase ของปัทุมมา
3. หาแนวทางยับยั้งหรือลดการผลิตเออทีลีนในดอกปัทุมมาโดยการนำยีน ACC synthase หรือ ACC oxidase ของปัทุมมา ส่งถ่าย โดยเทคนิค antisense
4. หาสภาวะในการส่งถ่ายยีนโดยการประยุกต์ใช้ "ไอออนบีมพลังงานต่ำ"

## วิธีทดลอง

### 1. การคัดหาเชิง ACC synthase และ ACC oxidase ของปทุมมา

#### 1.1 การเตรียมอาร์เอ็นเอ

นำกลีบดอกและกลีบเทียมของปทุมมาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว จากนั้นเก็บตัวอย่างที่ อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$  เพื่อนำไปใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ (total RNA) โดยใช้ RNeasy® Mini Handbook (QIAGEN). นำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.4% agarose/EtBr electrophoresis หลังจากนั้นนำไปเป็นต้นแบบในการทำ cDNA

#### 1.2 การสังเคราะห์ First Strand cDNA (RevertAid® First Strand cDNA Kit, Fermentas, U.S.A.)

#### 1.3 การแยก ACC synthase และ ACC oxidase ด้วยเทคนิค RT-PCR

หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากขั้นตอนการ RT-PCR ไปตรวจสอบด้วย Agarose electrophoresis ตัดແแทบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการโดยดูขนาดเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน เก็บไว้ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 ml ที่  $4^{\circ}\text{C}$  เพื่อนำมาแยกເອົາດีเอ็นເອອອກจากเจล (elute) แล้วนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แยกได้แล้วไปเพิ่มปริมาณโดยการ subclone  $4^{\circ}\text{C}$  เพื่อนำมาแยกເອົາดีเอ็นເອອອກจากเจล (elute) แล้วนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แยกได้แล้วไปเพิ่มปริมาณโดยการ subclone เข้าสู่พลาสมิดดีเอ็น เอ pGEM-Teasy โดยใช้ T4 DNA ligase ในการเชื่อมต่อดีเอ็นເອเข้ากับพลาสมิดแล้วนำไปส่งถ่ายเข้าสู่ แบคทีเรีย *E.coli* เช่น สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ , สายพันธุ์ JM109 ต่อไป

#### 1.4 การตรวจสอบแบคทีเรียที่ได้รับดีเอ็นເອสายพม (recombinant DNA) โดยการแยก พลาสมิดโดยวิธี Alkaline โดยดัดแปลงจากวิธีของ Maniatis *et al.*, 1982.

#### 1.5 การตรวจสอบพลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction Enzyme) ตรวจสอบ การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยทำ agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับแทบดีเอ็นເອ มาตรฐาน (molecular marker) เมื่อได้ clone ที่ได้รับชิ้นส่วนดีเอ็นເอที่ใส่เข้าไปแล้ว จึงนำไปหาลำดับ เบสและนำไปเทียบข้อมูลกับฐานข้อมูลเช่น NCBI ต่อไปได้ clone ที่ได้รับชิ้นส่วนดีเอ็นເอที่ใส่เข้าไปแล้ว จึงนำไปหาลำดับเบสและนำไปเทียบข้อมูลกับฐานข้อมูลเช่น NCBI ต่อไป

### 2. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน โดยวิธี Northern Blot

เตรียม RNA จากเนื้อเยื่อปทุมมาของส่วนต่างๆ เช่น ใบ ดอก ลำต้น กลีบเทียม มาสกัด RNA จากเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจปริมาณ 10  $\mu\text{g}$ . นำไปนำดีเอ็นເอที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ทำการย้ายดีเอ็นເอไปสู่ nylon membrane (Roche) และใช้ probe คือ DNA ที่เข้ารหัสยีน ACC synthase และ ACC oxidase ของปทุมมา ที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ดีเอ็น เอจากโคลนเป็นดีเอ็นເอต้นแบบ (จากข้อ 1) ซึ่ง probe จะถูกติดฉลากโดยใช้ชุด DIG High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II (Roche) หลังจากนั้นทำการ hybridization ที่  $68^{\circ}\text{C}$  และ

detection โดยใช้ chemiluminescence with CDP-Star (Roche) และ exposed โดย X-ray film (Amersham)

### 3. การศึกษา Character ของยีน

3.1 การเตรียม DNA จากใบปทุมมา ประยุกต์ใช้วิธีการของ (Doyle and Doyle, 1990)

3.2 การทำเทคนิค Southern blotting เพื่อหาจำนวน copy number ของยีน ACC synthase และ ACC oxidase โดยนำดีเอ็นเอจากข้อ 3.1 ปริมาณ 20 µg. นำมาตัดด้วยเอนไซม์เช่น EcoRI, HindIII, PstI และนำไป捺ดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ทำการย้ายดีเอ็นเอไปสู่ nylon membrane probe คือ DNA ที่เข้ารหัสยีน ACC synthase หรือ ACC oxidase ของปทุมมา ทำการ hybridization เช่นเดียวกับ Northern blot

3.3 ส่งถ่ายยีนด้วยวิธี antisense technique ของยีน ACC synthase และ ACC oxidase เข้าสู่เนื้อเยื่อปทุมมาโดย *A.tumefaciens*

3.3.1 ย้ายยีนสังเคราะห์เอนไซม์ ACC synthase หรือ ACC oxidase เข้าเชื่อมต่อในพลาสมิດแบบ antisense ในพลาสมิດ pBI121 (construction gene)

3.3.2 การส่งถ่ายพลาสมิດ ดีเอ็นเอ (pBI121) ACC synthase หรือ ACC oxidase การแยกพลาสมิດโดยวิธี Alkaline จากนั้นนำพลาสมิດที่ได้ส่งถ่ายเข้าสู่ *A. tumefaciens* โดยการทranส์ฟอร์เมชันด้วยวิธีอิเลคโทรโฟเรชันโดยใช้เงื่อนไขของเครื่องอิเลคโทรเตอร์ คือ สนามไฟฟ้าที่ 2.5 KV, 2.5 µF และ 200 ohms. จากนั้นทำการตรวจสอบโคลนที่ได้รับพลาสมิດและยีนที่ต้องการโดยการสกัดพลาสมิດดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะก่อนนำแบคทีเรียดังกล่าวไปทำการปลูกถ่ายเข้าสู่ปทุมมาและพืชตัวอย่างต่อไป

3.3.3 นำ *A. tumefaciens* ที่ผ่านการตรวจสอบแล้วมาเลี้ยง ในอาหารเหลวสูตร LB ที่มี 50 mg/l Rifampicin และ 100 mg/l kanamycin โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 °C เข่าที่ความเร็ว 150 rpm นาน 2 คืน จากนั้นนำไปปลูกถ่ายเข้าสู่เนื้อเยื่อปทุมมาโดยวิธีของ Supuk, 2006 หลังจากพืชพัฒนาเป็นต้น จึงนำมาตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีน โดยเทคนิค GUS Histochemical assay และเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) สำหรับ GUS gene และ 35S promoter ต่อไป

3.4 การตรวจสอบโดยเทคนิค GUS Histochemical assay (ดัดแปลงจาก Jefferson, 1987)

3.5 การตรวจสอบโดยใช้ปฎิกริยา PCR การเตรียมดีเอ็นเอพีชเพื่อปฎิกริยา PCR โดยนำเอาดีเอ็นเอที่ได้ทำ ปฎิกริยา PCR สำหรับการตรวจสอบ GUS gene (Stummer et al., 1995)

3.6 สังเกตลักษณะของต้นที่ได้รับการส่งถ่ายยีน โดยการวัดการเจริญเติบโต การผลิตเอธิลีน และลักษณะอื่นๆ ของต้นเปรียบเทียบกับต้นที่เป็นชุด control คือต้นที่ไม่ได้รับการส่งถ่าย และต้นที่ส่งถ่ายเฉพาะพลาสมิດดีเอ็นเอ

#### 4. การซักนำให้เกิดการส่งถ่ายยีนโดยใช้ไอออนบีมพลังงานต่ำ

4.1 นำตัวอย่างพืชมาวางบนแผ่นกระดาษขาว ที่ผ่านผ่าเชือแล้ว นำไปวางบนจานเลี้ยงเชือ นำไป ระดมยิงที่โดยใช้ Nitrogen ion (N+) พลังงาน 28-50 KeV และความถี่  $10^{14}$  ถึง  $10^{18}$  ions/cm<sup>2</sup> มี รายละเอียดคือ

##### 4.1.1 การหาเงื่อนไขที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการส่งถ่ายยีน

ตัดเทปภาวนาด 2x2 cm ติดลงบนจานเลี้ยงเชือแล้วนำไปนึ่งผ่าเชือและซินส่วนพืชที่ผ่านการเลี้ยงโดย การเพาะเลี้ยงเนื้อยื่อเช่น ใบดอกแ渭มยุราที่อายุประมาณ 7-15 วันตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 5x5 มิลลิเมตร นำไปวางบนเทปการที่ผ่านการผ่าเชือแล้ว นำตัวอย่างไประดมยิงด้วยเครื่องไอออน อิมพเลานเตอร์ CMU-3 ตามเงื่อนไขที่กำหนด

##### 4.1.2 หาอัตราการรอดของเซลล์แบคทีเรียหลังถูกระดมยิง

โดยเปรียบเทียบกับ control คือ Vac- เป็น control ที่อยู่ในสภาพปกติและไม่ถูกระดมยิง และ Vac+ เป็น control ที่อยู่ใน Vacuum และไม่ถูกระดมยิงโดยนำพืช ที่อยู่บนเทปความมาเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่มีฮอร์โมนในการเหมาะสมในการ regenerate ของพืชแต่ละชนิด นับจำนวนต้นที่เกิดขึ้นเทียบกับ control ทำการระบบยิงอีกครั้งในความรุนแรงที่ทำให้พืชมีชีวิตลดมากกว่า 50%

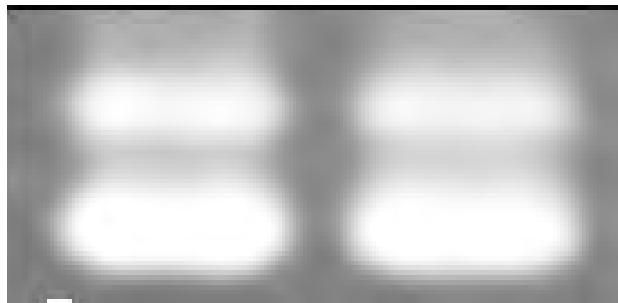
4.1.3 นำชิ้นพืชที่ผ่านการระดมยิงที่ความเข้มข้นของไอออนบีมที่เหมาะสม (จากการทดลองในข้อ 4.1.2) มาจุ่มในสารละลายที่มีพลาสมิดีเอ็นเอเชน pBI121 ที่บรรจุยีนที่เข้ารหัส ACC synthase ซึ่งบรรจุแบบ sense หรือ antisense ในความเข้มข้นต่างๆ เช่น 1, 10, 100 ไมโครกรัมของดี เอ็นเอ ในระยะเวลาที่จุ่มแตกต่างกันเช่น 1, 5, 10 นาที หลังจากนั้นนำเนื้อยื่อหรือชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการ ส่งถ่ายยีนไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีฮอร์โมน เพื่อการกระตุ้น regenerate ไปเป็นต้นต่อไป

4.1.4 นำต้นพืชที่ผ่านการส่งถ่ายยีนมาคัดเลือกโดยวิธีการตรวจสอบการทำงาน GUS gene และวิธี PCR ดังได้อธิบายมาแล้วข้างต้น (ข้อ 3.4 และ 3.5)

## ผลการทดลอง

### 1. การคัดหาเชิง ACC synthase และ ACC oxidase ของปทุมฯ

จากการเตรียม total RNA โดยการสกัดจากกลีบดอกและกลีบเทียมของปทุมมาบดให้ละเอียดในในตอรเจนเหลว จากนั้นเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$  เพื่อนำไปใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ (total RNA) โดยใช้ RNeasy®Mini Handbook (QIAGEN). นำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.4% agarose/EtBr electrophoresis พบว่า total RNA ที่ได้มีคุณภาพดีโดยจะสังเกตเห็นแอบ 28S และ 18S ribosomal RNA ดังแสดงดังภาพที่ 1



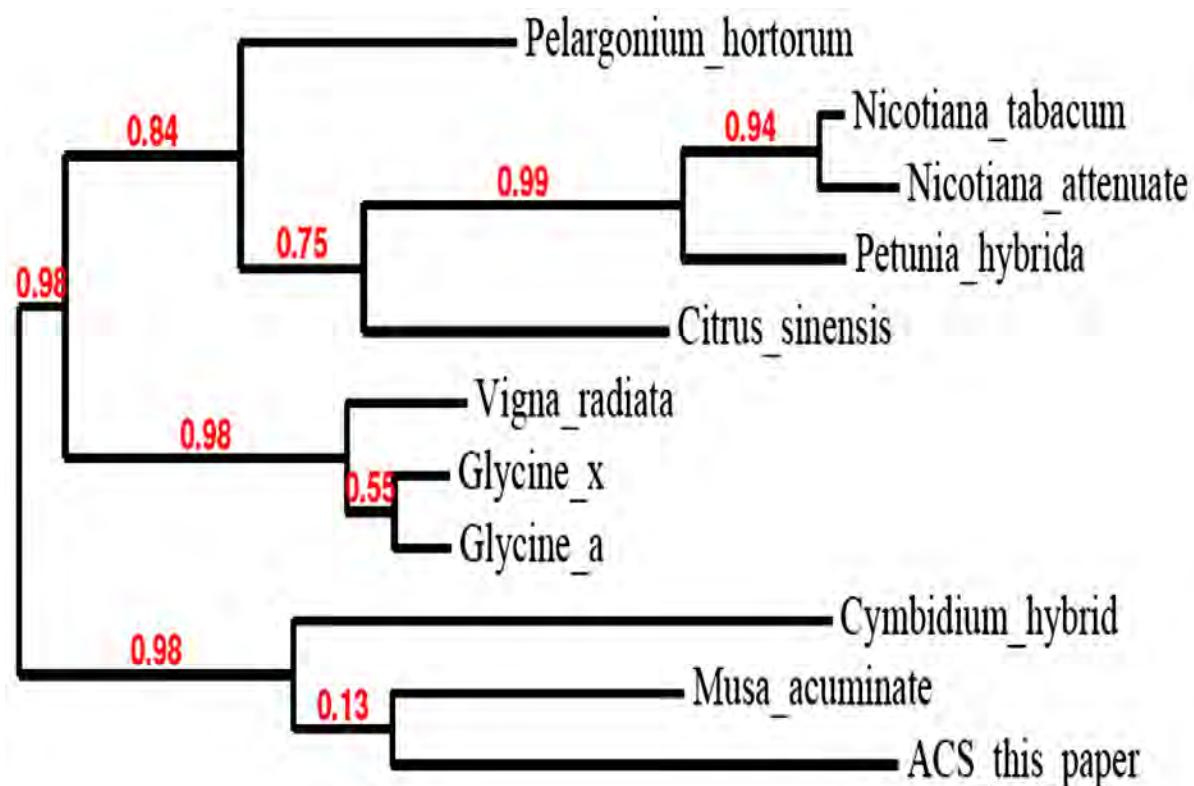
ภาพที่ 1 อาร์เอ็นเอที่ตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.4% agarose/EtBr electrophoresis

หลังจากนั้นนำไปเป็นต้นแบบในการทำ cDNA โดยการสังเคราะห์ First Strand cDNA (RevertAid® First Strand cDNA Kit, Fermentas, U.S.A.) เตรียมสารละลายลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 ml ซึ่งประกอบด้วย อาร์เอ็นเอหั้งหมัด 0.1-5  $\mu\text{g}$ , oligo(dT)<sub>18</sub> primer 0.5  $\mu\text{g}$  และ deionized water ให้ครบ 20  $\mu\text{l}$  ผสมให้เข้ากันเบาๆ บ่มที่  $70^{\circ}\text{C}$  นาน 5 min จากนั้นแช่หลอดบนน้ำแข็งแล้วเติม 1x reaction buffer, RiboLock™ Ribonuclease inhibitor 20 Unit/reaction และเติม dNTPs 1 mM (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่  $37^{\circ}\text{C}$  นาน 5 min จากนั้นเติม RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase 200 Unit/reaction บ่มที่  $42^{\circ}\text{C}$  นาน 1 hr และหยุดปฏิกิริยาโดยความร้อนที่  $70^{\circ}\text{C}$  นาน 10 min เก็บ First Strand cDNA ไว้ที่  $-70^{\circ}\text{C}$  นำไปเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอโดยขบวนการ RT-PCR โดยมีสภาวะของการทำดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงเงื่อนไขของปฏิกริยา PCR ในเทคนิค RT-PCR เพื่อแยกดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500-600 คู่เบส

อุณหภูมิ	94 °C	94 °C	56 °C	72 °C	72 °C	4 °C
ระยะเวลา	2 min	45 sec	45 sec	1 min	10 min	$\alpha$
จำนวนรอบ		   35 รอบ   				

หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วย restriction enzyme ไปตรวจด้วย agarose electrophoresis ตัดແղบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการโดยดูขนาดเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน เก็บไว้ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 ml ที่ 4°C เพื่อนำมาแยกເອົາດีเอ็นເອອກຈາກເຈລ (elute) แล้วนำชิ้นส่วนดีเอ็นເອທີ່ແຍກໄດ້ແລ້ວໄປເພີ່ມປະມາມໂດຍການ subclone 4°C เพื่อนำมาแยกເອົາດีเอ็นເອອກຈາກເຈລ (elute) แล้วนำชิ้นส่วนดีเอ็นເອທີ່ແຍກໄດ້ແລ້ວໄປເພີ່ມປະມາມໂດຍການ subclone เข้าสู่พลาສມິດດີເອັນເອ คือ pGEM-Teasy โดยໃຊ້ T4 DNA ligase ในการเชื่อมต่อດີເອັນເອเข้าກັບพลาສມິດแล้วนำໄປສ່າງຄ່າຍເຂົ້າສູ່ແບຄທີ່ເຮີຍ *E.coli* ສາຍພັນຫຼຸ *DH5α* ຜົ່ງມີການຄັດເລືອກແບຄທີ່ເຮີຍໂດຍດູລັກໜະນະສີຂາວໜຶ່ງແສດງບັນອາຫາຮັດເລືອກ ຈາກນັ້ນນຳແບຄທີ່ເຮີຍທີ່ຄາດວ່າໄດ້ຮັບການສ່າງຄ່າຍຢືນໄປການตรวจສອບແບຄທີ່ເຮີຍທີ່ໄດ້ຮັບດີເອັນເອສາຍຜສມ (recombinant DNA) ໂດຍການແຍກ ພລາສມິດໂດຍວິທີ Alkaline ໂດຍດັດແປລງຈາກວິທີຂອງ Maniatis *et al.*, 1982. ແລ້ວການตรวจສອບພລາສມິດໂດຍການຕັດດ້ວຍເອນໄໝ່ມົດຕັດຈຳເພາະ (restriction Enzyme) ຕາມການຕັດດ້ວຍເອນໄໝ່ມົດຕັດຈຳເພາະໂດຍທຳ agarose gel electrophoresis ໂດຍເປີຍບ່ອຍກັບແບບດີເອັນເອມາຕຽານ (molecular marker) ເນື້ອໄດ້ clone ທີ່ໄດ້ຮັບชັ້ນສ່ານດີເອັນເອທີ່ໄສເຂົ້າໄປແລ້ວ ຈຶ່ງນໍາໄປຫາລຳດັບເບສແລະນໍາໄປເຖິນຂ້ອມໜູນກັບຈຽານຂ້ອມໜູນເຊັ່ນ NCBI ພບວ່າສັນສ່ານດີເອັນເອທີ່ໄດ້ເປັນຢືນທີ່ເຂົ້າຮ້າສເອົ້າໜີ້ໜີ້ເທສແລະເອົ້າໜີ້ອກໜີ້ເດສສົ່ງເນື້ອນໍາເອາລຳດັບເບສໄປກາແປລງເປັນກາຣດອະນິໂນ ແລ້ວການເປີຍບ່ອຍກັບພື້ນໜີດອື່ນມີຄວາມເໜືອນກັບພື້ນໜີດອື່ນໆ ອື້ອ ໃນເອົ້າໜີ້ໜີ້ເທສມີລຳດັບເໜືອນກັບພື້ນໜີ້ອື່ນ 69-82 % ໂດຍໄປເໜືອນກັບພື້ນໜີ້ດັງຕ່ອງໄປນີ້ *Musa acuminata*, *Cymbidium sp.*, *Vigna radiate*, *Citrus sinensis*, *Pelargonium hortorum*, *Petunia* ແລະ *Nicotiana tabacum* ສ່ານເອົ້າໜີ້ອກໜີ້ເດສມີລຳດັບເໜືອນກັບພື້ນໜີ້ອື່ນຄື່ອນໃຈຈຽານຂ້ອມໜູນ NCBI ອື້ອ *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum*, *Pelargonium hortorum*, *Prunus persica* ແລະ *Trifolium repens* ໂດຍມີຄວາມເໜືອນ 80 %, 79%, 77% 76% ແລະ 75% ຕາມລຳດັບ ດັງແສດງໃນກາພທີ 2 ແລະ 3 ໂດຍຢືນເອົ້າໜີ້ໜີ້ເທສ ແລະເອົ້າໜີ້ອກໜີ້ເດສໃນກາວົງຈິນທີ່ໃຫ້ວ່າ *Ca-ACS1* ແລະ *Ca-ACO1* ຕາມລຳດັບ



ภาพที่ 2 การเปรียบเทียบความเหมือนของยีนเอชีชีซินเทสจากงานวิจัยกับพืชชนิดอื่นๆ ในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม Phylogenetic PhyML program.

<i>S. nuberianum</i>	ENWGFFFIV	HGISHDLMDT	VERLTKEHYK	KCMEQRFKEM	VASKGLEAVQ	TEIDDLWES	10
<i>N. tabacum</i>	ENWGFFFVNN	HGISHELLDT	VERLTKGHYK	KCMEERFKEM	VASKGLEAVQ	TEIDDLWES	
<i>P. hordeiformis</i>	ENWGFFFELLN	HGIFYELLDT	VEKMTKEHYR	KCMEQRFKEM	VASKGLEAVE	VEVEDDLWES	
<i>P. persica</i>	ENWGFFFELVN	HGISHELMDT	VERLTKEHYK	KCMEQRFKEM	VASKGLEAVQ	SEIDDLWES	
<i>T. repens</i>	ENWGFFFELVN	HGISHDLMDT	VERLTKEHYR	IC MEQRFKDL	VANKGLEAVQ	TEVKDMIDWES	
PCa-ACOI	ENWGFFFELGL	HGISHDLDT	VEKMTKDHYE	KQMEQRFKEM	VASKGLEAVQ	TEKEDDLWES	
	*****	*****	***	****	***	***	
<i>S. nuberianum</i>	IFFLKHLPV	NISEVPDLED	DYRKIMKEFA	DKLEKLAEQL	LDLICENLGL	EQGYLKKAFY	110
<i>N. tabacum</i>	TFFLKHLPI	NISEVPDLED	EYRKIMKEFA	ENLEKLAEQL	LDLICENLGL	EQGYLKKAFY	
<i>P. hordeiformis</i>	TFFLKHLPIE	NISQVPDLQD	EYRKVMKEFA	AKLEKLAEL	LDLICENLGL	EQGYLKKAFY	
<i>P. persica</i>	TFFLRHLPV	NISQIPDLDE	DYRKVMKEFA	VELEKLAEQL	LDLICENLGL	EQGYLKKAFY	
<i>T. repens</i>	TFHLRHLPIE	NISEVPDLDE	DYRKANKEFA	LKLEKLAEL	LDLICENLGL	EQGYLKKAFY	
PCa-ACOI	TFFLRHLPIE	NISEVPDLDE	EYRKIMKEFA	DELEKLAEQL	LDLICENLGL	EQGYLKKAFY	
	*****	***	***	*****	*****	*****	
<i>S. nuberianum</i>	GSKGPTFGTK	VSNYPPCPKP	DLIKGLRAHT	DAGGIILLFQ	DDKVSGLQLL	KDGKWDVPP	120
<i>N. tabacum</i>	GSKGPTFGTK	VSNYPPCPKP	DLIKGLRAHT	DAGGIILLFQ	DDKVSGLQLL	KDGKWDVPP	
<i>P. hordeiformis</i>	GSKGPTFGTK	VSNYPPCPKP	DLIKGLRAHT	DAGGLILLFQ	DDKVSGLQLL	KDGKWDVPP	
<i>P. persica</i>	GSKGPNPGTK	VSNYPPCPKP	DLIKGLRAHT	DAGGIILLFQ	DDKVSGLQLL	KDGQWIDVPP	
<i>T. repens</i>	GRKGPTFGTK	VANYPPCPKP	DLVKGLRAHT	DAGGIILLFQ	DDKVSGLQLL	KDGKWDVPP	
PCa-ACOI	GSKGPTFGTK	VSNYPPCPKP	ELIKGLRAHT	DAGGKILLFQ	DDKVSGLQLL	KDSKWIIDVPP	
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
<i>S. nuberianum</i>	MHHSIVNLG	DQLEVITNGK	VKS				130
<i>N. tabacum</i>	MRHSIVNLG	DQLEVITNGK	VKS				
<i>P. hordeiformis</i>	MHHSIVNLG	DQLEVITNGK	VKS				
<i>P. persica</i>	MHHSIVNLG	DQLEVITNGK	VKS				
<i>T. repens</i>	MHHSIVNLG	DQLEVITNGK	VKS				
PCa-ACOI	MTHSIVNLG	DQLEVITNGK	VKS				
	*****	*****	***				

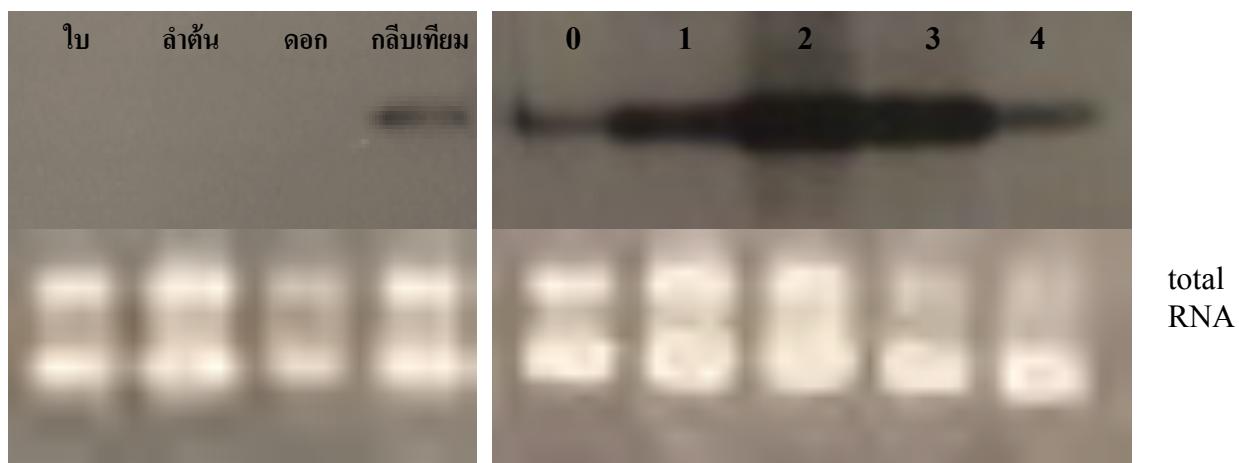
ภาพที่ 3 การเปรียบเทียบความเหมือนของยีนเอชซีอีกซิเดสจากงานวิจัยกับพีชชนิดอื่นๆ ในฐานข้อมูล NCBI โดยเครื่องหมาย \* แสดงความเหมือนของกรดอะมิโนในพีชแต่ละชนิด

## 2. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน โดยวิธี Northern Blot

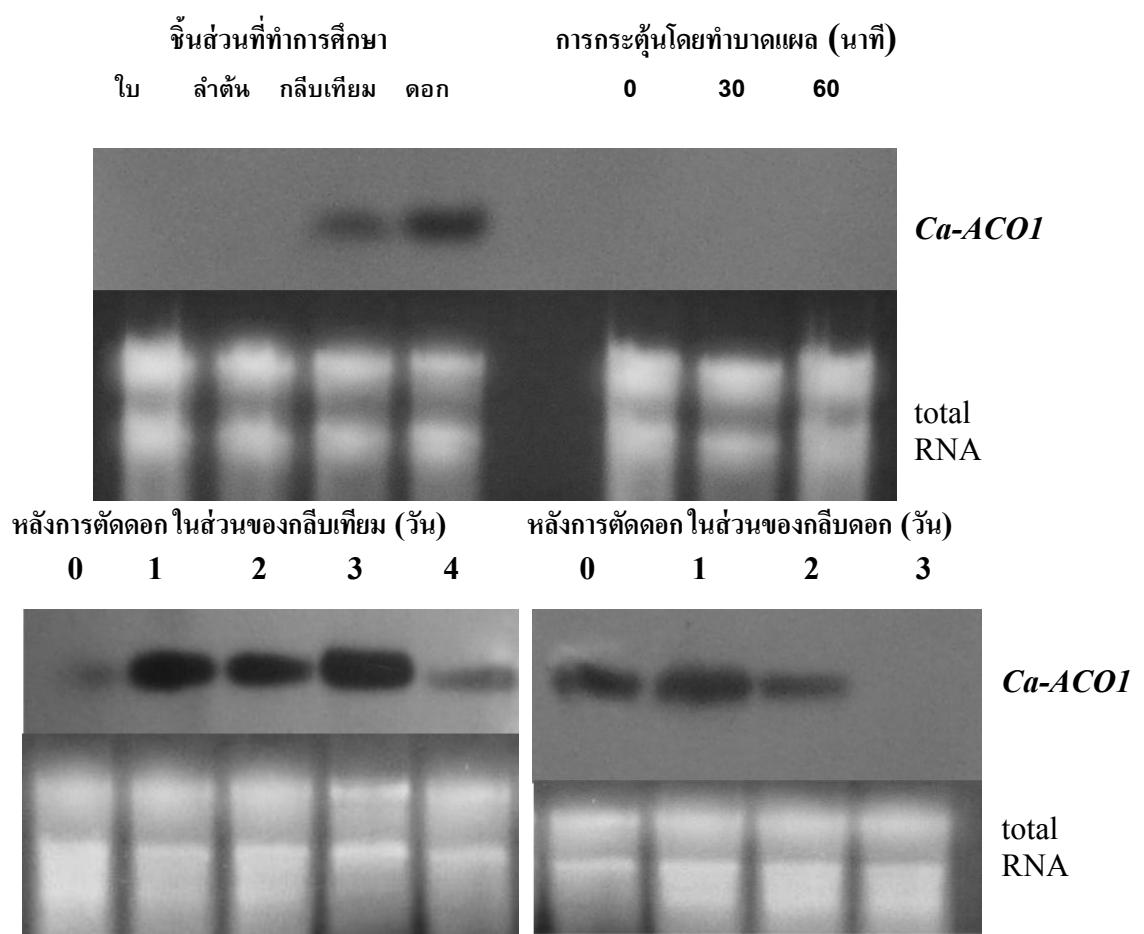
จากการเตรียม RNA จากเนื้อเยื่อปทุมมาของส่วนต่างๆ เช่น ใบ ดอก ลำต้น กลีบเทียม มาสกัด RNA จากเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจปริมาณ 10  $\mu$ g. นำไปนำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ทำการย้ายดีเอ็นเอไปสู่ nylon membrane (Roche) และใช้ probe คือ DNA ที่เข้ารหัสยีน ACC synthase และ ACC oxidase ของปทุมมา ที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ดีเอ็นเอจากโคลนเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (จากข้อ 1) ซึ่ง probe จะถูกติดฉลากโดยใช้ชุด DIG High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II (Roche) หลังจากนั้นทำการ hybridization ที่ 68 °C และ detection โดยใช้ chemiluminescence with CDP-Star (Roche) และ exposed โดย X-ray film (Amersham) ผลปรากฏว่ายีน Ca-ACS/ ตรวจพบในกลีบเทียมของดอกปทุมมาและมีการแสดงออกอย่างชัดเจนในกลีบเทียมหลังจากตัดดอกแล้ว 2 วัน ดังภาพที่ 4 ส่วนในยีน Ca-ACO/ ตรวจพบในกลีบดอกและกลีบเทียมหลังจากตัดดอกแล้ว 1 วัน โดยไม่แสดงออกในส่วนของกลีบเทียม ดังภาพที่ 5

ชิ้นส่วนที่ทำการศึกษา

หลังการตัดดอก ในส่วนของกลีบเทียม (วัน)



ภาพที่ 4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน Ca-ACS/ โดยวิธี Northern Blot

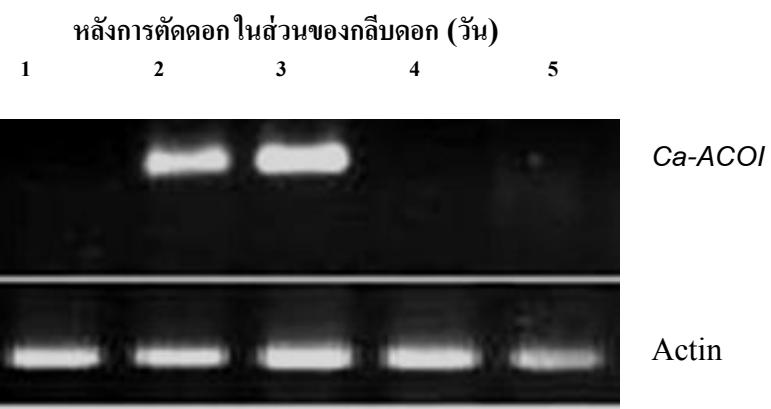
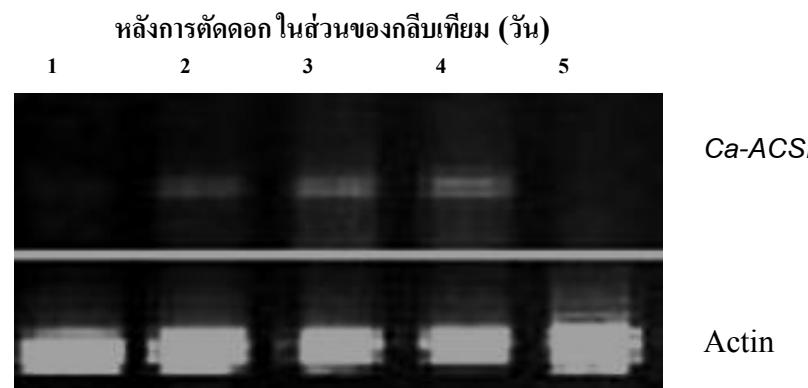


ภาพที่ 4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน Ca-ACO1 โดยวิธี Northern Blot

เมื่อทำการแสดงออกของยีน *Ca-ACS1* และ *Ca-ACO1* โดยเทคนิค RT-PCR โดยใช้สภาวะตามตารางที่ 2 พบว่าผลปรากฏว่ายีน *Ca-ACS1* ตรวจพบในกลีบเทียมของดอกปทุมมาและมีการแสดงออกอย่างชัดเจนในกลีบเทียมหลังจากตัดดอกแล้ว 2 ถึง 3 วัน ส่วนในยีน *Ca-ACO1* ตรวจพบในกลีบดอกปทุมมาและมีการแสดงออกอย่างชัดเจนในกลีบดอกและกลีบเทียมหลังจากตัดดอกแล้ว 1 ถึง 2 วัน ดังภาพที่ 5

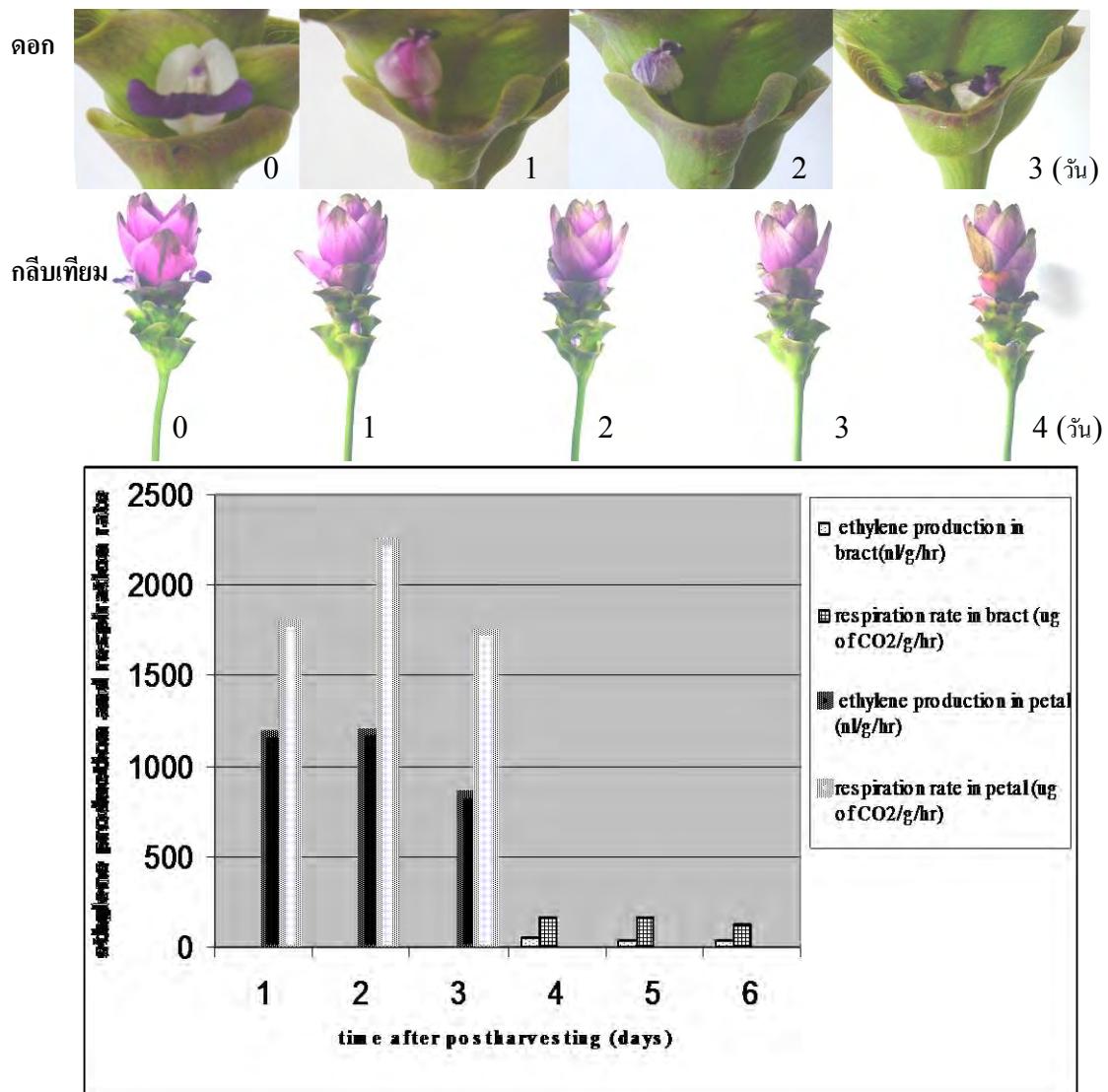
ตารางที่ 2 แสดงเงื่อนไขของปฏิกริยา PCR ในเทคนิค RT-PCR เพื่อแยกดีเอ็นเอโดยใช้เพเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน *Ca-ACS1* และ *Ca-ACO1*

อุณหภูมิ	94°C	94 °C	59°C	72°C	72 °C	4°C
ระยะเวลา	2 min	45 sec	45 sec	1 min	10 min	α
จำนวนรอบ		← 35 รอบ →				



ภาพที่ 5 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Ca-ACS1* และ *Ca-ACO1* โดยวิธี RT-PCR

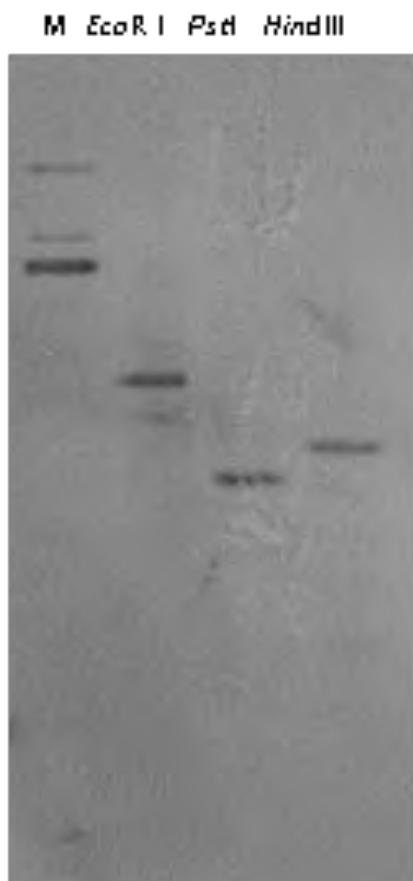
โดยการแสดงออกของยีน *Ca-ACSI* ที่ตรวจพบในกลีบเทียมของดอกปทุมมาและมีการแสดงออกอย่างชัดเจนในกลีบเทียมหลังจากตัดดอกแล้ว 2 วัน และยีน *Ca-ACO1* มีการแสดงออกอย่างชัดเจนในกลีบดอกและกลีบเทียมหลังจากตัดดอกแล้ว 1 วัน นั้นมีความสอดคล้องกับการผลิตเอทิลีนในดอกปทุมมาหลังการตัดดอกดังภาพที่ 6 กล่าวคือปริมาณเอทิลีนในดอกมีปริมาณสูงในวันที่ หลังจาก การตัดดอก



ภาพที่ 6 ลักษณะดอกปทุมมาและการผลิตเอทิลีนหลังตัดดอก

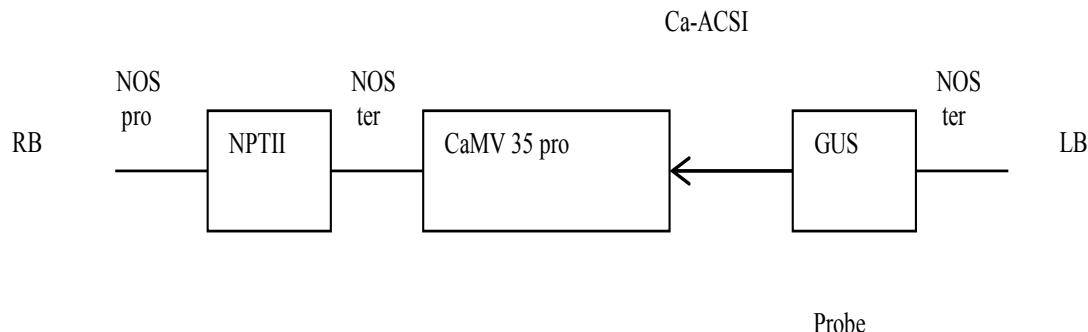
### 3. การศึกษา Character ของยีน

การเตรียม DNA จากใบปุ่มมา ประยุกต์ใช้วิธีการของ (Doyle and Doyle, 1990) แล้วทำการวิเคราะห์โดยเทคนิค Southern blotting เพื่อหาจำนวน copy number ของยีน ACC synthase โดยนำดีเอ็นเอจากข้อ 3.1 ปริมาณ 20 µg. นำมาตัดด้วยเอนไซม์เช่น *Eco*RI, *Pst*I, *Hind*III และนำไป捺ดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ทำการย้ายดีเอ็นเอไปสู่ nylon membrane probe คือ DNA ที่เข้ารหัสยีน *Ca-ACS1* ของปุ่มมา ทำการ hybridization เช่นเดียวกับ Northern blot พบว่ายีน *Ca-ACS1* มีตำแหน่งเดียวกันเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวดังแสดงในภาพที่ 7



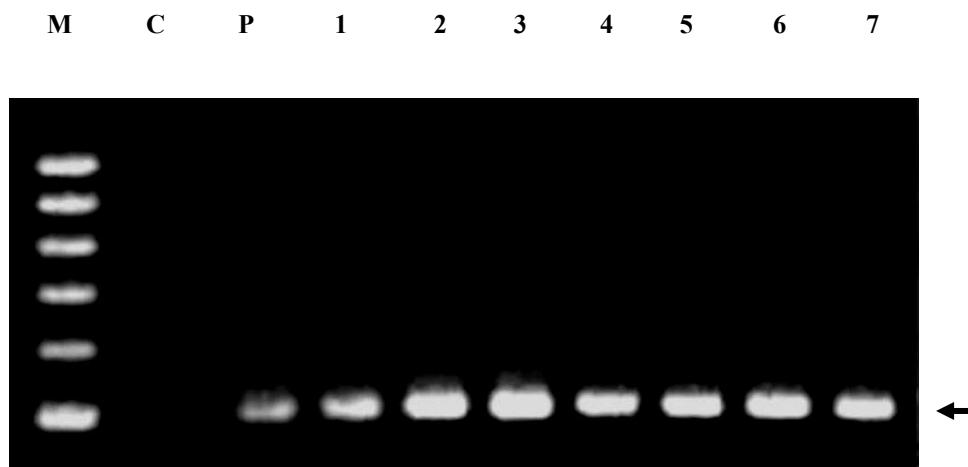
ภาพที่ 7 การวิเคราะห์ *Ca-ACS1* โดยเทคนิค Southern blotting

จากนั้นทำการส่งถ่ายยีนด้วยวิธี antisense technique ของยีน ACC synthase เข้าสู่เนื้อเยื่อปทุมมาโดย *A.tumefaciens* โดยถ่ายยีนสังเคราะห์เอนไซม์ ACC synthase หรือ ACC oxidase เข้าชื่อมต่อใน พลasmidแบบ antisense ในพลาสมิด pBI121 (construction gene) ดังแสดงในภาพที่ 8

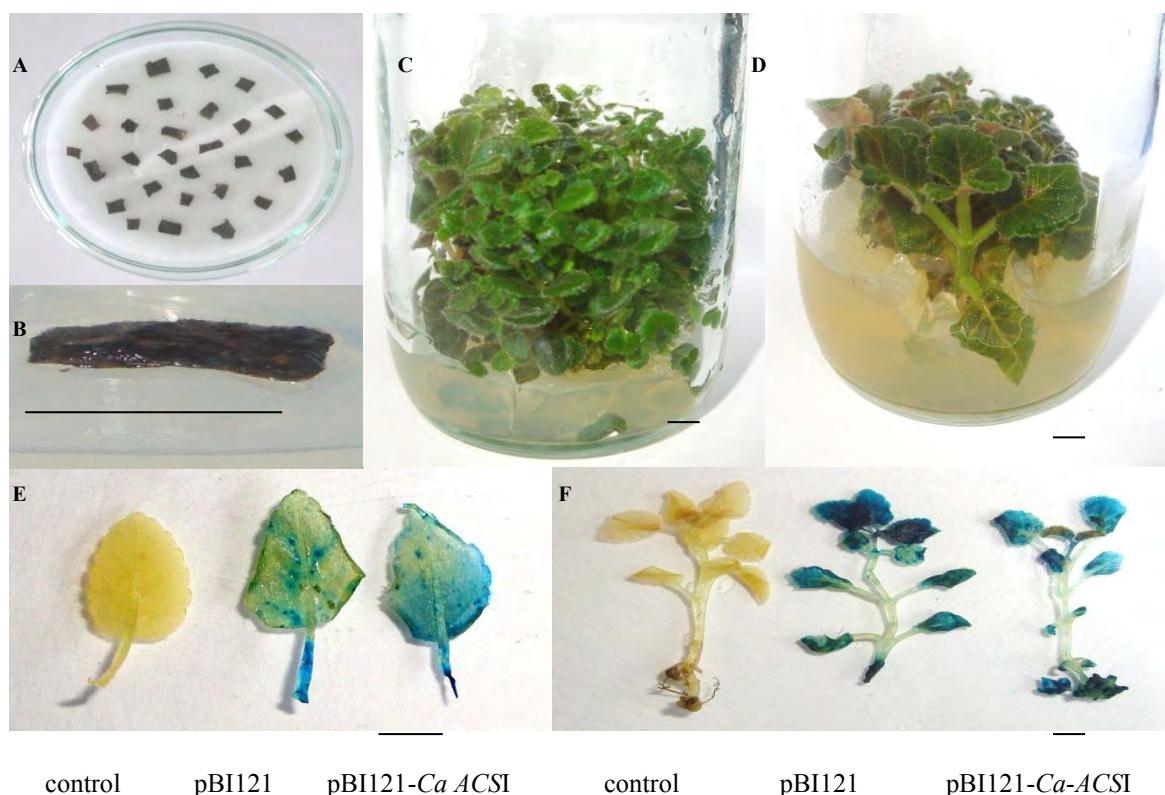


ภาพที่ 8 ภาพตำแหน่งการเชื่อมต่อ yīnแบบ antisense ของยีน Ca-ACSI ในพลาสมิด pBI121

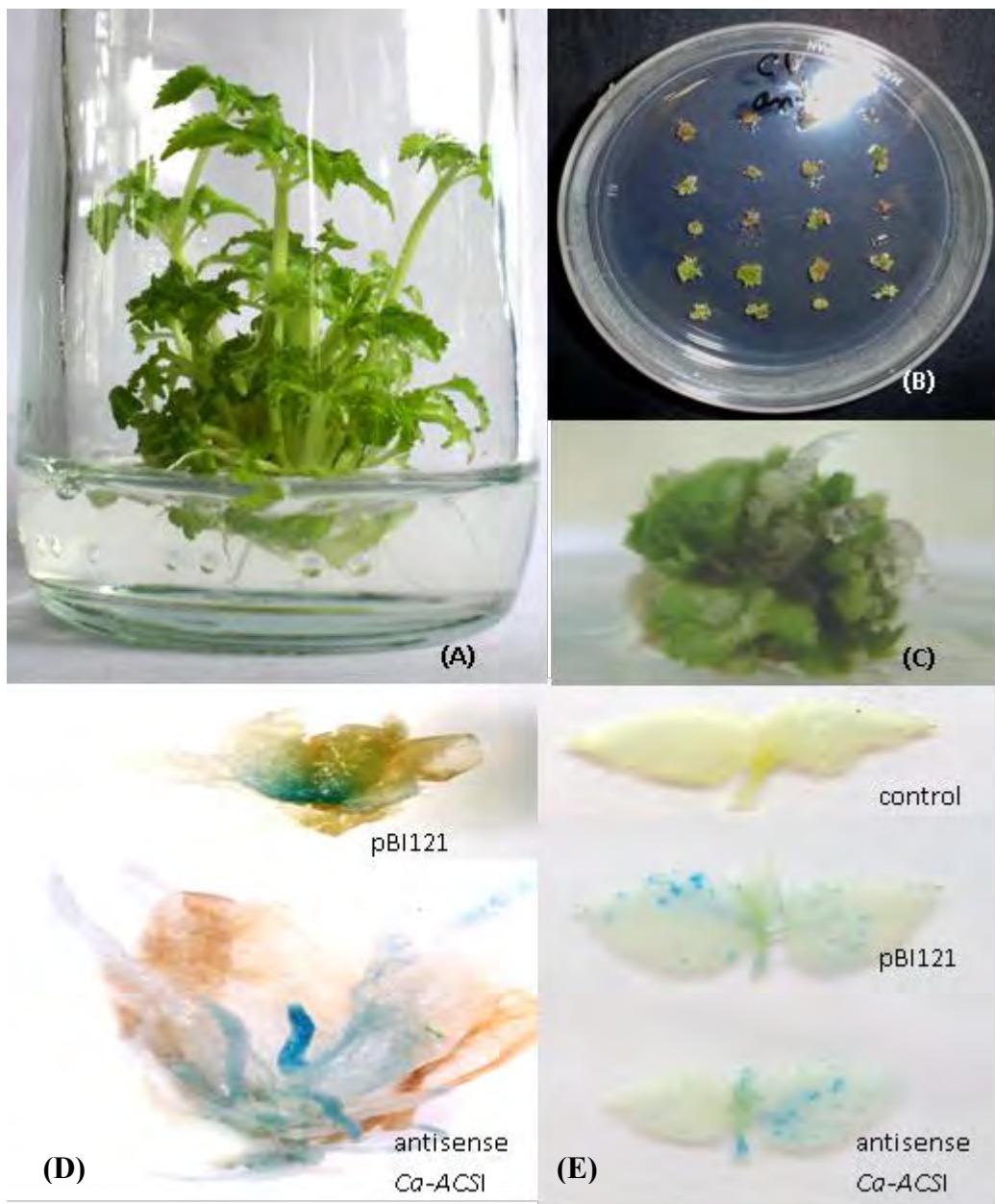
หลังจากการเชื่อมต่อ yīnแบบ antisense ในพลาสมิด pBI121 แล้วส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสานเข้าสู่แบคทีเรีย *A. tumefaciens* โดยการทราานไฟฟอร์เมชันด้วยวิธีอิเล็คโทรไฟเรชันโดยใช้เงื่อนไขของเครื่องอิเล็คโทรเตอร์ คือ สนามไฟฟ้าที่ 2.5 kV, 2.5  $\mu$ F และ 200 ohms. จากนั้นทำการตรวจสอบโคลนที่ได้รับพลาสมิดและยีนที่ต้องการโดยการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะก่อนนำแบคทีเรียดังกล่าวไปทำการปลูกถ่ายเข้าสู่พืชตัวอย่าง โดยนำ *A. tumefaciens* ที่ผ่านการตรวจสอบแล้วมาเลี้ยง ในอาหารเหลวสูตร LB ที่มี 50 mg/l Rifampicin และ 100 mg/l kanamycin ที่อุณหภูมิ 28 °C เขย่าที่ความเร็ว 150 rpm นาน 2 คืน จากนั้นนำไปปลูกถ่ายเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชตัวอย่างคือ กลือกซีเนีย (*Sinningia speciosa*) และ แพรอมยูรา (*Torenia fournieri*) โดยวิธีของ Supuk, 2006 หลังจากพืชพัฒนาเป็นต้น จึงนำมาตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีน โดยเทคนิค GUS Histochemical assay และเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) พบว่าพืชตัวอย่างที่ทำการส่งถ่ายพับແກบดีเอ็นเอที่ใช้ไฟเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน GUS gene ดังแสดงในภาพที่ 9 และเนื้อเยื่อพืชแสดงการทำงานของ GUS gene โดยแสดงสีน้ำเงินในตัวอย่างพืช ดังแสดงในภาพที่ 10-11



ภาพที่ 9 การตรวจพีซตัวอย่างที่ผ่านการส่งถ่ายยืนโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไฟเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีนในการตรวจสอบ GUS gene เมื่อ M คือ DNA Marker, C คือ พีซที่ไม่ได้ส่งถ่ายยืน และ P คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ, 1-7 คือพีซที่ผ่านการส่งถ่ายยืน

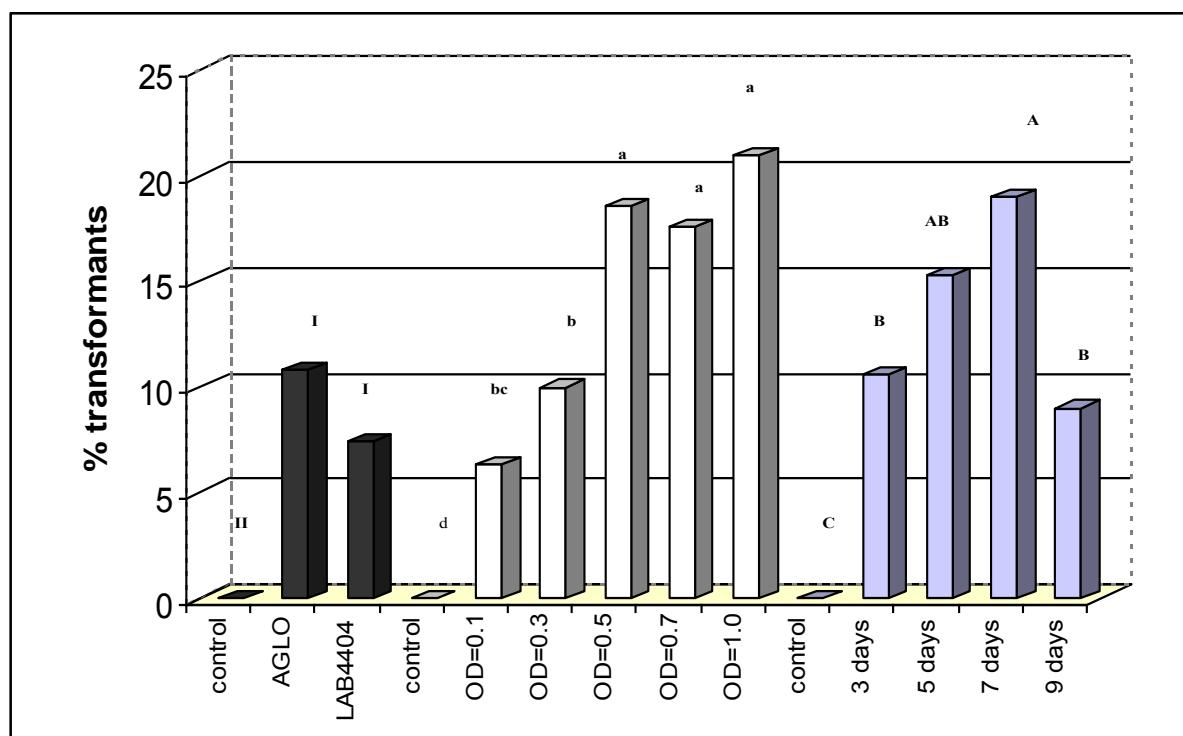


ภาพที่ 10 การตรวจการทำงานของ GUS gene ในเนื้อเยื่อกลีอกซีเนีย (*Sinningia speciosa*) เมื่อ A-D คือ เนื้อเยื่อพีซที่เพาะเลี้ยงใน tissue culture และ E-F คือเนื้อเยื่อที่ตรวจสอบการแสดงออกของ GUS gene

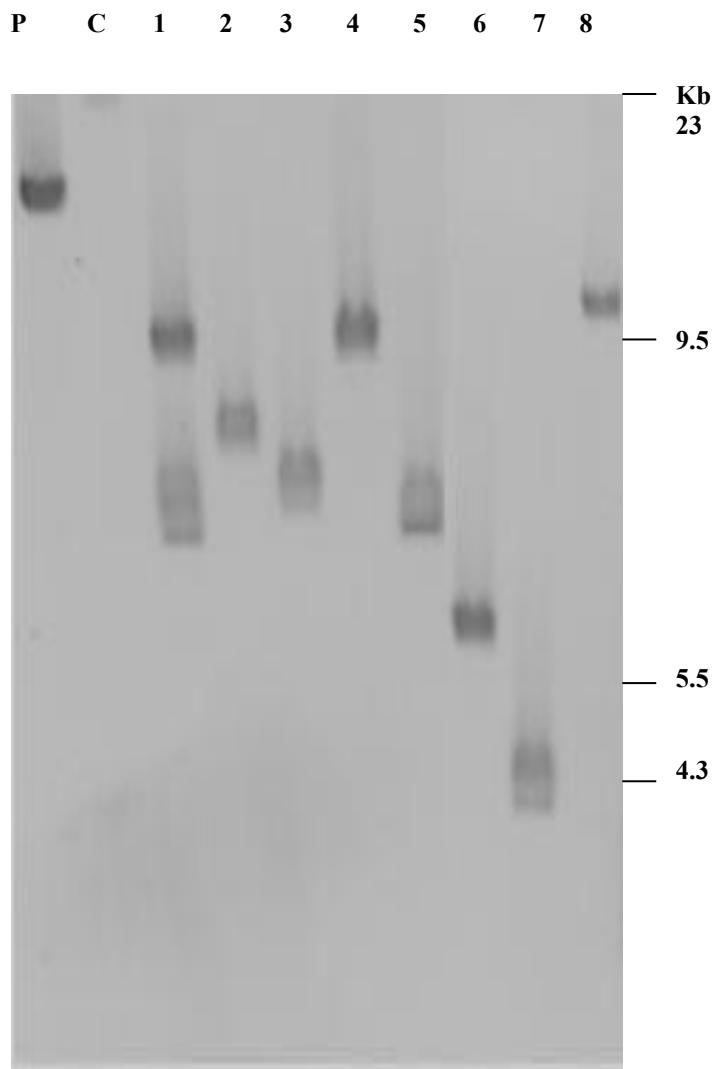


ภาพที่ 11 การตรวจการทำงานของ GUS gene ในเนื้อเยื่อใน แ渭นยูรา (*Torenia fournieri*) และปทุนมาเมื่อ A-C คือ เนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงใน tissue culture และ D-E คือ เนื้อเยื่อที่ตรวจสอบการแสดงออกของ GUS gene ในปทุนมาและแ渭นยูรา

นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชตัวอย่างโดยเลือกใช้พิชกลือกซีเนียซึ่งเปรียบเทียบชนิดของ *A. tumefaciens* ชนิดต่าง ๆ คือ AGLO และ LBA4404 โดยพบว่าสายพันธุ์ AGLO ให้ประสิทธิภาพการส่งถ่ายสูงกว่า LBA4404 จึงเลือกสายพันธุ์ AGLO ในการเปรียบเทียบความเข้มข้นของแบคทีเรียโดยทดลองตั้งแต่ความเข้มข้นของแบคทีเรียที่มีค่า O.D. 0.1- 1.0 จากการทดลองพบว่าที่ O.D. ค่าเท่ากับ 1.0 ให้ประสิทธิภาพการส่งถ่ายมากที่สุดและเมื่อนำแบคทีเรียที่มีค่า O.D. 1.0 ดังกล่าวไปทดสอบในการบ่มกับเนื้อยื่อในระยะเวลาที่แตกต่างกันคือตั้งแต่ 3 ถึง 9 วัน พบว่า บ่มเชือกับเนื้อยื่อเป็นเวลา 7 วัน จะทำให้ประสิทธิภาพการส่งถ่ายมากที่สุดดังแสดงในภาพที่ 12 และเมื่อสุ่มตัวอย่างกลือกซีเนียที่ผ่านการส่งถ่ายไปตรวจสอบตำแหน่งของแทรกตัวของยีนพบว่าการแทรกตัวของยีนที่ส่งถ่ายเข้าสู่พืชได้ในตำแหน่งที่แตกต่างกันดังภาพที่ 13



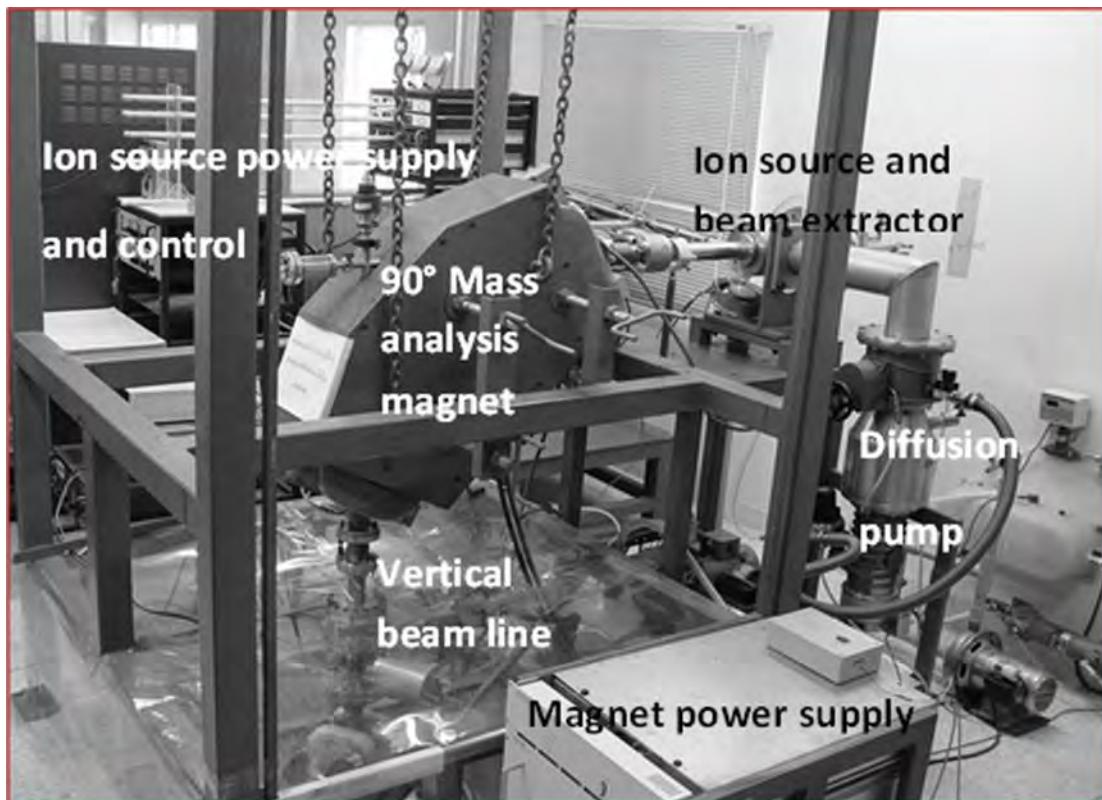
ภาพที่ 12 การตรวจสอบที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชตัวอย่าง



ภาพที่ 13 การตรวจสอบตำแหน่งของยีนที่ทำการส่งถ่ายในกลีอกซ์เนียโดยวิธี Southern blot analysis โดย ยีน GUS เป็น probe เมื่อ P คือ พลasmidดีเอ็นเอ (pBI121), C คือ พีซที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน และ 1-8 คือพีซที่ผ่านการส่งถ่ายยีน

#### 4. การซักนำให้เกิดการส่งถ่ายยืนโดยใช้ไอออนบีมพลังงานต่ำ

เมื่อนำตัวอย่างพีซโดยนำใบของแวนมูรากจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออายุประมาณ 1 เดือน มาตัดขนาดประมาณ  $0.5 \times 0.5$  cm วางบนแผ่นกระดาษที่ผ่านฟลักเซอร์แล้ว นำไปวางบนจานเลี้ยงเชือกนำไปประดมยิงที่โดยใช้ Nitrogen ion (N+) พลังงาน 28-50 KeV และความถี่  $10^{14}$  ถึง  $10^{18}$  ions/cm<sup>2</sup> โดยตัดเทปการขนาด 2x2 cm ติดลงบนจานเลี้ยงเชือกแล้วนำไปนึ่งฟลักเซอร์และซึ้งส่วนพีซที่ผ่านการเลี้ยงโดยการเพาะเลี้ยง นำไปวางบนเทปการที่ผ่านการฟลักเซอร์แล้ว นำตัวอย่างไปประดมยิงด้วยเครื่องไอออนอิมพเลนเตอร์ CMU-3 ซึ่งมีส่วนประกอบต่างๆ ดังภาพที่ 14 ตามเงื่อนไขที่กำหนด



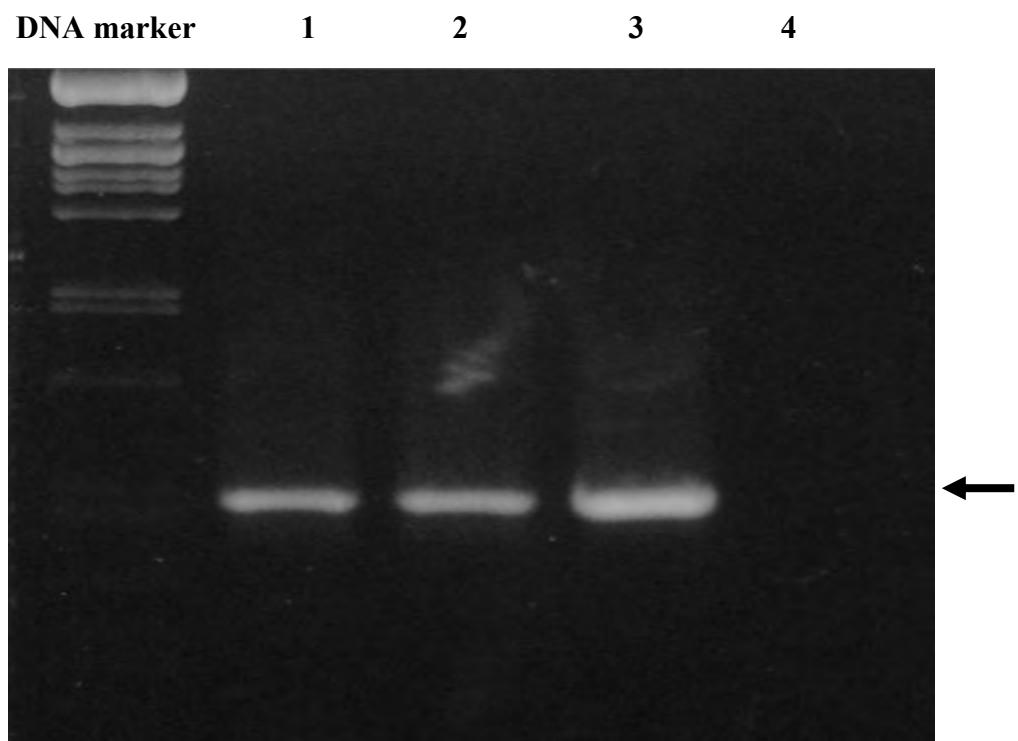
ภาพที่ 14 เครื่องไอออนอิมพเลนเตอร์ CMU-3

จากนั้นนำตัวการลดของเซลล์แบคทีเรียหลังจากประดมยิงโดยเบรี่ยบเทียบกับ control คือ Vac- เป็น control ที่อยู่ในสภาพปกติและไม่ถูกประดมยิง และ Vac+ เป็น control ที่อยู่ใน Vacuum และไม่ถูกประดมยิงโดยนำพีซ ที่อยู่บนเทปการมาเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่มีออร์โนนในการเหมาะสมในการ regenerate ของพีซแต่ละชนิด นับจำนวนตันที่เกิดขึ้นเทียบกับ control ทำการระบบยิงอีกครั้งในความรุนแรงที่ทำให้พีซมีชีวิตลดมากกว่า 50% และจึงนำตัวอย่างเพื่อนำมาระดมยิงด้วยสภาวะเดิมอีกครั้งพิจารณาที่พลังงาน 30 keV และความถี่  $10^{15}$  ions/cm<sup>2</sup> ทำให้เกิดการส่งถ่ายยืนมากที่สุด

### ตารางที่ 3 การทดสอบการส่งถ่ายยีนโดยใช้ไอออนบีมพลังงานต่ำ

Application low-energy ion beam at an energy of 30 keV with a different fluence range	Percentage of explants showing <i>GUS</i> spots (%)		Frequency of transformed shoot showing positive PCR	
	pBI121	pBI121- <i>Ca-ACSI</i>	pBI121	pBI121- <i>Ca-ACSI</i>
$10^{14}$ ions/cm <sup>2</sup>	2	4	8	8
$10^{15}$ ions/cm <sup>2</sup>	4	6	12	14
$10^{16}$ ions/cm <sup>2</sup>	0	4	6	12

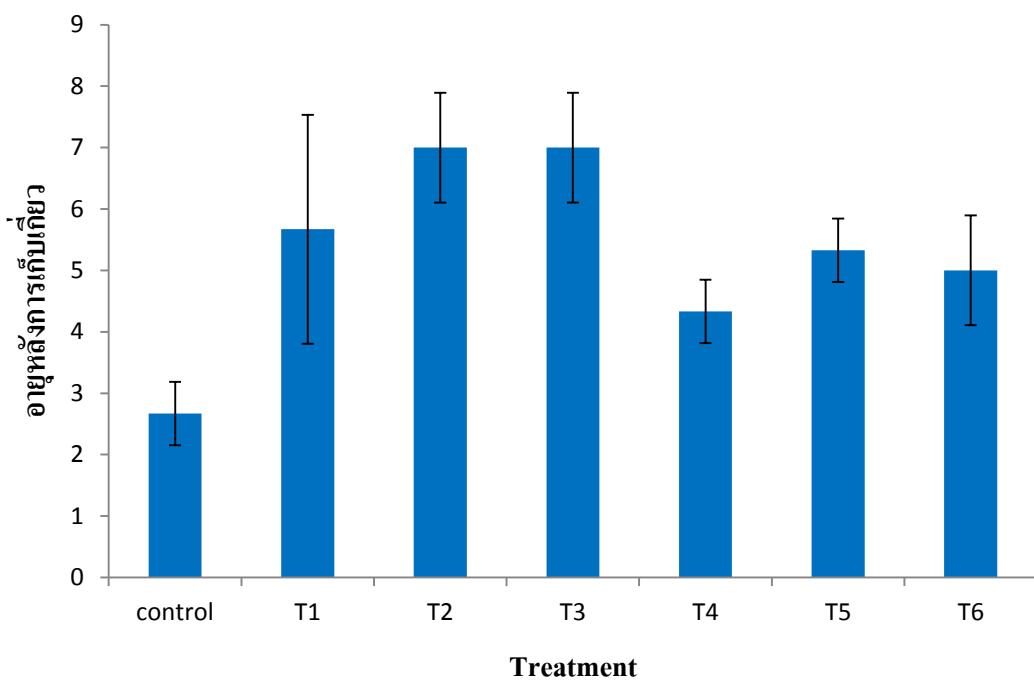
เมื่อนำชิ้นพืชที่ผ่านการระดมยิงที่ความเข้มข้นของไบโอนบีมที่เหมาะสม มาจุ่มในสารละลายที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอเช่น pBI121 ที่บรรจุยีนที่เข้ารหัส ACC synthase ซึ่งบรรจุแบบ sense และ antisense ในความเข้มข้นต่างๆ เช่น 1, 10, 100 ไมโครกรัมของดีเอ็นเอ ในระยะเวลาที่จุ่มแตกต่างกัน เช่น 1, 5, 10 นาที จากการทดลองพบว่าการจุ่มที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม และ 5 นาที ให้ประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนมากที่สุด หลังจากนั้นนำเนื้อยื่อหรือชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการส่งถ่ายยีนไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีออร์โนน เพื่อการระตุน regenerate ไปเป็นต้นแล้วนำต้นพืชที่ผ่านการส่งถ่ายยีนมาคัดเลือกโดยวิธีการตรวจสอบ PCR และการทำงาน GUS gene ซึ่งพบว่าในพืชที่ทำการส่งถ่ายยีนมีແกบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 bp ซึ่งเป็นขนาดของยีนที่คาดหมายของ GUS gene ดังแสดงในภาพที่ 15 นอกจากนี้พืชตัวอย่างยังแสดงการทำงานของ GUS gene โดยแสดงสีน้ำเงินขึ้นหลังจากการทำ GUS Histochemical assay ตั้งภาพที่ 16 หลังจากนั้นนำพืชต้นที่ผ่านการส่งถ่ายยีนไปเลี้ยงในสภาวะหลอดทดลองและบ้ำยสูงรุ่ง杲 เพื่อตรวจสอบระยะทดลองและอายุดอก พบร่วมกับการส่งถ่ายมีอายุดอกที่นานกว่าในพันธุ์เดิมดังแสดงในภาพที่ 17



ภาพที่ 15 การตรวจสอบพีซที่ได้รับการส่งถ่ายโดยไออกอนบีมพลังงานต่ำ โดย 1 คือ plasmid pBI121, 2 คือ พีซที่ส่งถ่ายด้วย plasmid pBI121, 3 คือ พีซที่ส่งถ่ายด้วย pBI121-Ca-ACS1 และ 4 คือ พีซที่ไม่ได้ส่งถ่ายยืน



ภาพที่ 16 พืชตัวอย่างการทำงานของ GUS gene โดยแสดงสีน้ำเงินขึ้นหลังจากการทำ GUS Histochemical assay โดย A คือ พืชที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน, B คือ พืชที่ส่งถ่าย plasmid pBI121 และ C คือ พืชที่ส่งถ่ายด้วย pBI121-Ca-ACS1



ภาพที่ 17 อายุดอกของแ渭มยุราหลังจากได้รับการส่งถ่ายยีนเบรีเยนเทียบกับพันธุ์เดิม เมื่อ T1-T6 คือพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีนแบบ antisense ของยีน Ca-ACS1

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลองและข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

งานวิจัยนี้ได้รายงานถึงการกระตุ้นให้เกิดการส่งถ่ายยีนในพืชโดยใช้ไอโอนบีมพลังงานต่ำ โดยมีวัตถุประสงค์ในของการวิจัยคือการยับยั้งการแสดงออกของยีนเอชีซีชีนเทสในดอกปทุมมา โดยเบื้องต้นทำการแยกชิ้นส่วนของซีดีเอ็นเอที่เข้ารหัสยีนเอชีซีชีนเทส และเอชีซีออกซิเดส จากดอกปทุมมาจากนั้นนำมาศึกษาลำดับเบสและการแสดงออกของยีนโดยวิธี Northern blot และ RT-PCR พบร่วมกับส่องมีการแสดงออกในดอกปทุมมาในระหว่างหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งจากการทดลองจะการแสดงออกของยีนที่ส่องมีความสอดคล้องกับการสร้างเอทริลีนในดอกปทุมมาและการสื่อสารทางชีวภาพของดอก จึงคาดว่าทั้งสองยีนเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการสังเคราะห์เอทริลีน ทั้งสี่จึงทำการส่งถ่ายยีนแบบ antisense เพื่อเป้าหมายในการยับยั้งการแสดงออกของยีนดังกล่าวในพืชตัวอย่างคือ กลีโคซีเนีย และดอกแ渭วมยุรา เนื่องจากเป็นพืชที่มีอายุสั้น ส่วนในต้นปทุมมานั้นหากผ่านขบวนการส่งถ่ายและตรวจลักษณะดอกหลังการส่งถ่ายจะใช้เวลานานคือประมาณ 2-3 ปี แต่จากการวิจัยก็ทำให้ทราบแนวทางการยับยั้งการสื่อสารทางชีวภาพของดอก เนื่องจากในดอกแ渭วมยุราพบว่าเมื่อทำการส่งถ่ายยีน Ca-ACS1 แบบ antisense จะทำให้สามารถยืดอายุดอกได้ และมีลักษณะพีโนไทบ์อีนฯ เช่นลักษณะดอก สี เหมื่อนพันธุ์เดิม นอกจานี้จากการวิจัยพบว่าการประยุกต์ใช้ไอโอนบีมพลังงานต่ำที่พลังงาน 28–50 keV ที่ความถี่  $10^{14}–10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup> สามารถกระตุ้นให้เกิดการส่งถ่ายได้ในดอกแ渭วมยุรา ส่วนในปทุมมา เนื่องจากที่นำมาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความชื้นมาก ทำให้ไม่สามารถนำไปกระตุ้นให้เกิดการส่งถ่ายได้ในสภาวะดังกล่าว ได้เนื่องจากการยิงด้วยลำไโออนต้องอยู่ในสภาวะสุญญากาศ ทำให้ยากในการดูดความชื้นจากเนื้อเยื่อตัวอย่างออกได้หมด ซึ่งในงานวิจัยในอนาคตจำเป็นต้องหาสภาวะในการกระตุ้นด้วยลำไโออนใหม่โดยอาจใช้ชิ้นส่วนของพืชส่วนอื่น ๆ เช่นเมล็ด หรือห่อหุ้มเนื้อเยื่อด้วยสารเคลือบผิว ก่อน ทั้งนี้หากงานวิจัยดังกล่าวสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมได้ก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการพัฒนาพันธุ์ปทุมมาโดยเทคโนโลยีชีวพิสิกส์ เนื่องจากไอโอนบีมนั้นมีรายงานว่าสามารถทำให้เกิดการกลยุทธ์ในพืชได้ โดยในอนาคตต้องใกล้กันนี้จะมีการต่อยอดงานวิจัยเพื่อปรับปรุงพันธุ์ปทุมมาต่อไป

## ภาคผนวก

### การเตรียมสารเคมี

#### 1. DNA Extraction Buffer

ลำดับที่	สารเคมี
1.	0.7 M NaCl
2.	10mM EDTA pH = 8.0
3.	50mM Tris-HCl pH = 8.0
4.	4% CTAB
5.	1.5% PVPP
6.	20mM $\beta$ -mercaptoethanol
7.	100 $\mu$ g/ml RNase
8.	Deionized Water

#### 2. การเตรียม agarose gel

การเตรียม 01.4 % agarose gel ละลายน้ำใน TBE buffer ปริมาตร 100 ml ใส่ลงใน flask ขนาด 100 ml นำไปอุ่นให้ละลายจนหมด จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอจนเจลอุ่นประมาณ 60°C จากนั้นเทลงบนชุดประกอบเจลและใส่หัวเสียง (comb) จากนั้นรอให้เจลแข็งตัวประมาณ 10-15 นาที

#### 3. การเตรียม 5X TBE buffer

ส่วนประกอบ :	Tris-base	54 g
	Boric acid	27.5 g
	EDTA	4.65 g
	Autoclaved distilled water	1000 ml

ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

#### 4. การเตรียม TE buffer

ส่วนประกอบ :	Tris-base	40 mM
	EDTA	2 mM

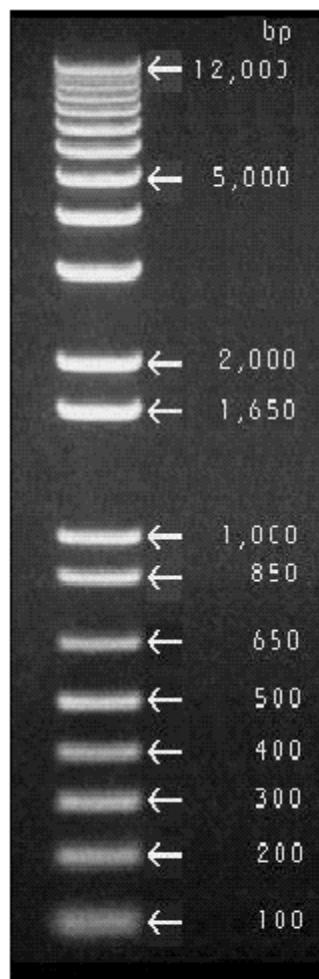
นำส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เข้ากัน แล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วย glacial acetic acid นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

##### 5. การเตรียม Gel loading buffer (6X)

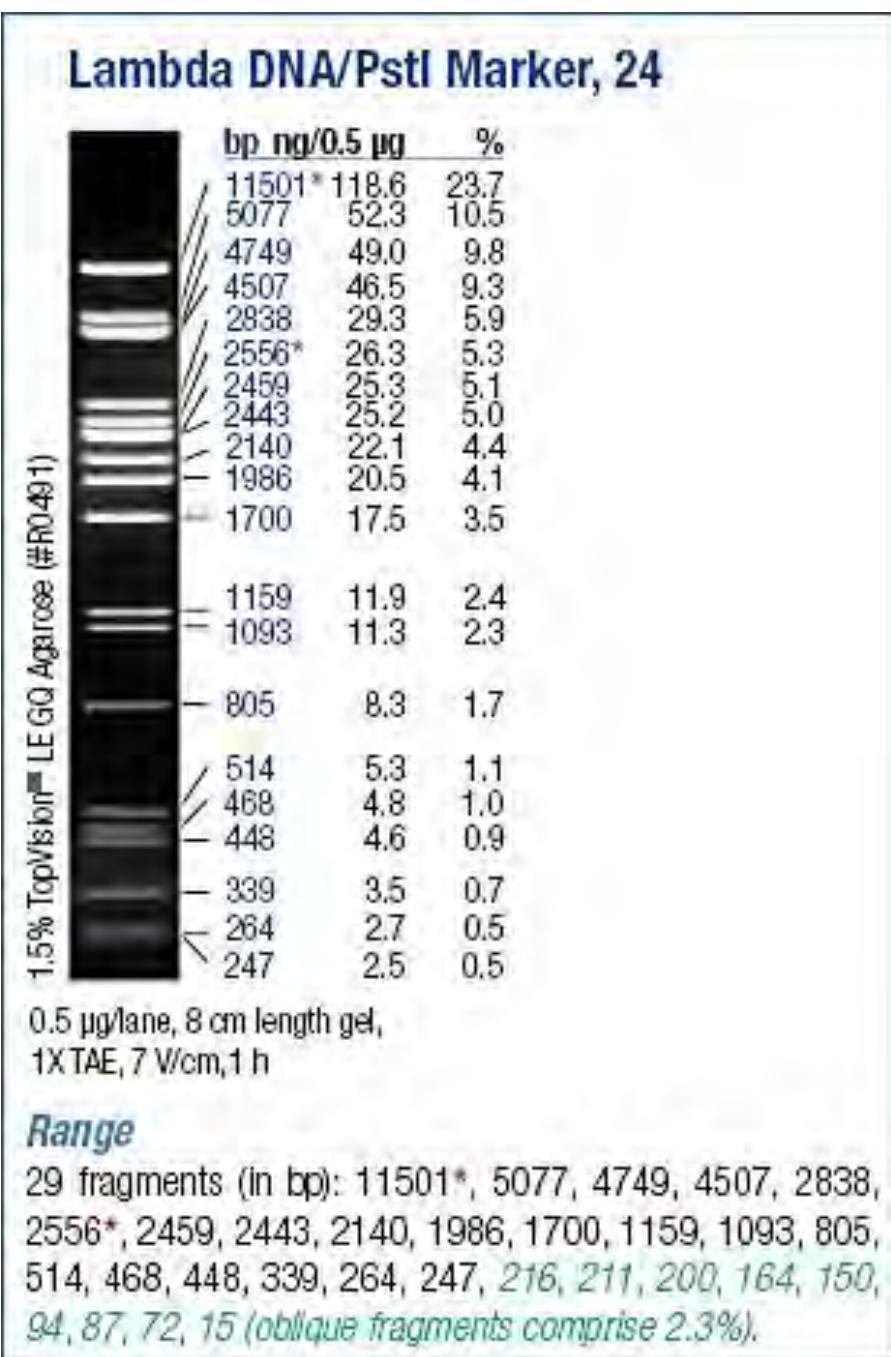
ส่วนประกอบ :	Bromophenol blue	0.5%
	Xylene cyanol	0.25%
	Glycerol	30%

ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บรักษาในตู้เย็น 4 °C

##### ภาพแสดงขนาดของ DNA Marker



**1 Kb PLUS DNA LADDER**  
**0.7 µg/lane**  
**0.9% agarose gel**



## **Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกอ.**

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ  
อยู่ระหว่างการส่งเพื่อตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติอย่างน้อยจำนวน 2 เรื่อง ดังรายละเอียดของเอกสารแนบท้าย
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์  
เชิงวิชาการ มีการพัฒนาการเรียนการสอน 2 วิชาคือ วิชาเทคโนโลยีชีวภาพพีซ และวิชาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สร้างนักวิจัยใหม่จำนวน 2 คน ซึ่งปัจจุบันกำลังศึกษาต่อในระดับปริญญาโท มหาวิทยาลัยพะเยา
3. อื่นๆ มีการเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ 2 เรื่อง ดังรายละเอียดของเอกสารแนบท้าย

เอกสารแนบท้าย  
การนำเสนอผลงานในระดับนานาชาติ

# Proceedings International Conference on Biotechnology for Healthy Living

The 22<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology

TSB 2010  
20-22 October 2010



Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand





## Molecular cloning of genes involving in flower senescence-association from *Curcuma alismatifolia* gagnep. and its transformation into *Sinningia speciosa*

S. Mahadtanapuk<sup>1</sup>, S. Amuntalabhochai<sup>2</sup>, M. Sangwantermari<sup>3</sup>, W. Tera-arunai<sup>3</sup> and W. Namakorn<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao 56000, Thailand

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

<sup>3</sup>University of Phayao, Phayao 56000, Thailand

<sup>4</sup>The Crown Property Bureau, Durit, Bangkok 10300, Thailand

### Abstract

Aim of this work was to reduce ethylene production, resulting in delay of flower senescence by antisense technology, the cDNA fragments encoding ACC synthase and ACC oxidase from *Curcuma alismatifolia* Gagnep. were isolated and their expression were analyzed. To determine the expression of *Ca-ACSI* or *Ca-ACOI*, RT-PCR was used for gene analysis by specific primer. The result showed that the *Ca-ACSI* and *Ca-ACOI* genes were detected in bract of curcuma and the highest expression was observed at postharvesting. Moreover the *Ca-ACSI* was subcloned into pBII121 with antisense orientation resulting in pBII121-*Ca-ACSI*, and then transformed into model plant (*Sinningia speciosa*) by *Agrobacterium tumefaciens* strain AGLO and LBA4404. In addition, efficient plant regeneration and transgenic plant with antisense technique using the model plants in difference condition were studied. Integration of the T-DNA, GUS assay and Southern analyses. At present, the transgenic plants grow happily in the greenhouse and their phenotypic is under investigation.

**Keywords:** *Agrobacterium*, transformation, *Sinningia speciosa*, *Curcuma alismatifolia* Gagnep.

\*Corresponding author

E-mail: [burinka@hotmail.com](mailto:burinka@hotmail.com)

### Introduction

*Curcuma alismatifolia* Gagnep. (Pathumma) is commonly known as an economical flower plant in the north of Thailand. It is a mono cotyledonous perennial, a member of ginger family Zingiberaceae. Most curcuma plants grow and flower during the rainy season in Thailand. rhizome is planted during April to May and flowers occur during July to September. During December to January, new rhizomes with new storage roots are harvested and exported to the customers during January to March (Roh *et al.*, 2006). *C. alismatifolia* Gagnep., which has wide variations in shape and bract color, has been cultivated for cut flowers, potted plants and garden plants. Inflorescence of *C.*



*alismatifolia* contains green basal bracts and coma bracts with pink color. The Curcuma plants are commercially propagated from subterranean organs, consisting of a rhizome or stubbed rhizome with several storage roots (Roh and Lawson, 1993; Hagiladi *et al.*, 1997). Its vase life is determined by browning and wilting of the coma bracts. This browning relates to ethylene production (Bunya-Atchart *et al.*, 2004). The senescence of flowers many ornamental plants is under the influence of ethylene (Borochov and Woodson, 1989) and it could be delayed by suppression of genes encoding proteins in ethylene biosynthetic pathway. Ethylene synthesis occurs via the enzymes 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase and ACC oxidase which catalyse the reactions from S-adenosylmethionine to ACC and ACC to ethylene, respectively (Adams and Yang, 1979). In this research, one of the main objectives is to shorten the breeding time for improving vase life of curcuma flower by antisense technique. Isolation and expression analysis of ACC synthase gene are necessary for manipulation of ethylene biosynthesis in curcuma. Moreover, to introduce desirable traits into curcuma by gene transformation system, an efficient regeneration protocol is essential. However, 2-3 years are need from regenerated tissue to be mature plant of curcuma. It seems that, if the production of ethylene can be reduced in the model plants, it may be possible to delay senescence process in transgenic curcuma plants. Therefore, the suppression of the genes involving in ethylene biosynthesis that regulate flower senescence of curcuma should extend its flower longevity.

#### Materials and Methods

##### RNA isolation and Cloning

Total RNA from fresh Curcuma (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.) flower was extracted by using RNeasy® Mini Handbook (QIAGEN). The RNA was used as templates for the reverse transcription PCR (RT-PCR) with degenerated forward and reverse primers designed from highly conserved domains of ACC synthase sequences such as TNPSNPLGTT (F1), PGWFRVCFAN (R1) (forward primer1 : 5' PAC IAA YCSITC IAA YCC ICT IGG IAC, reverse primer1 : 5' CG(CT) TT(AG) TG(ACGT) G(GT)(CT) TTG GT. For ACC oxidase, degenerated forward and reverse primers were derived from ENWGFFE(F1) and TNGKYKS (R1) amino acid segment (forward primer1 : 5' GAR AAY UGG GGI UUY GAR and reverse primer1 : 5' ACI AAY GGI AAR UAY AAR AGY), respectively. The amplified cDNAs were ligated into pGEM T-easy plasmid and named pGEM-Teasy-Co-ACSI or pGEM-Teasy-Co-ACOI. The plasmid vectors that positively hybridized with the genes were sequenced by BSU (Bio Service Unit), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Bangkok, Thailand and the sequences obtained were analyzed with the Genome Net (NCBI) database.

##### Gene expression by RT-PCR analysis

Total RNA was isolated from bracts at different times from harvested flowers using RNeasy® Mini Handbook (QIAGEN). The RNA was used as template for RT-PCR.



specific forward and reverse primers of *Ca-ACSI* or *Ca-ACOI* were designed. While primers of GAPDH genes were used for internal control. In 20  $\mu$ l total volume of PCR reaction mixture contained 20 ng of the cDNA, 200  $\mu$ M dNTPs, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl, 0.25  $\mu$ M of each primer and 2 unit of *Tag* polymerase. PCR products were separated by electrophoresis on 1% agarose gel.

#### Plant Transformation

*Agrobacterium tumefaciens* strain AGLO or LBA4404 harboring binary plasmid with antisense *Ca-ACSI* (pBI121-*Ca-ACSI*) (Fig 1A) was used. The bacteria was cultured overnight in Luria-Bertani (LB) medium containing 50 mg/L kanamycin and 50 mg/L rifampicin at 28 °C. The density of the bacteria was adjusted to 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 and 1.0 (O.D. 600) with 10 mM glucose and 100  $\mu$ M acetosyringone (AS). The 0.5x0.5 leaf section of *Sinningia speciosa* was used for transformation (Fig. 3A, B). The explants were incubated in the bacteria suspension and cultured *in vitro* as described by Mahadtanapuk *et al.* (2006). Then the explants were transferred onto regeneration MS medium (Murashige and Skoog 1962) supplemented with 1.0 mg/L BA and 0.5 mg/L NAA and 50 mg/L kanamycin. The explants were subcultured every 2 weeks onto the same medium. The transformants were detected using PCR technique and GUS histochemical assay as described by Jefferson *et al.* (1987).

#### Histochemical GUS assays

A histochemical GUS assay was conducted as described by Jefferson *et al.* (1987). The histochemical GUS assay of the regenerated plants confirmed transformation events. The *S. speciosa* tissues were treated with 1  $\mu$ mol X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucuronide) for 5-12 h at 37 °C then chlorophyll was removed by soaking in ethanol.

#### Southern hybridization

Genomic DNA (10  $\mu$ g) of *S. speciosa* was digested with *Hind*III, and then separated by electrophoresis in 0.8% agarose gel and transferred to a nylon membrane (Roche). The 2.0 kb *Bam*HI-*Sac*I fragment containing the *GUS* gene was purified from pBI121 using a QIAquick Gel Extractionkit (QIAGEN), and was used as a probe for analysis. The DNA probe was labeled by DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche), according to the manufacturer's instructions.

#### Results and Discussion

Amplification product of the ACC synthase was 645 bp by using primers designed from TNPSNPLGTT and PGWFRVCFAN amino acid. The PCR products of the gene were used for subsequent cloning steps. By sequencing recombinant clones of ACC synthase, they were found to contain the same sequences. The cDNA of 645 bp contains an open reading frame encoding 215 amino acids. A homology search was performed using the BLAST program, National Center for Biotechnology Information



(NCBI). When the sequence of fragment was compared with those already registered in the database, *Ca-ACSI* exhibited its homology to *Musa acuminata*, *Pelargonium hortorum*, *Citrus sinensis*, *Vigna radiata*, *petunia* and *Nicotiana tabacum* with 69-82% similarity. For isolation of the cDNA encoding ACC oxidase gene, the results of the PCR revealed the specifically amplified product about 600 bp fragments. Then the fragments were subcloned into pGEM T-easy and sequenced. The sequences of the fragment suggested that the fragment contained 609 bp (203 amino acids) of an ACC oxidase gene. When the nucleotide sequences of *Ca-ACOI* were compared, they were highly homologous to those of ACC oxidase from several plants, such as *Solanum tuberosum*, *N. tabacum*, *Pelargonium hortorum*, *Prunus persica*, *Trifolium repens* with 80%, 79%, 77%, 76% and 75% identities, respectively.

In this paper, for investigation the expression of *Ca-ACSI* and *Ca-ACOI*, the senescence related gene of *C. aizymalifolia* Gagnep., RT-PCR with specific primers was used. The result showed the genes were highest expression at postharvesting of cut flower. The high expression of the *Ca-ACSI* gene at 1 to 3 days in bracts were found (Fig. 1B). Also, the transcript of *Ca-ACOI* was found in the bracts at 1 to 2 days during storage (Figure 1C). This result was related to the increasing of respiration and the ethylene production of open florets as they approached senescence (Mahadtanapuk *et al.*, 2010). After that the *Ca-ACSI* was subcloned into pBI121 with antisense orientation resulting in pBI121-*Ca-ACSI*, and then was transformed into model plant (*S. speciosa*) by *A. tumefaciens* strain AGLO and LBA4404 with the density of 0.5 and 7 days of co-cultivation. The transformant detected with positive *GUS* gene showed that the efficient of transgenic plant production by two bacteria strains was not significantly different. For the density of the bacteria strain AGLO at 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 and 1.0, the transformed plantlets with 0.5, 0.7 and 1.0 combined with 7 days of co-cultivation were presented high percentage of transformation. However, the contamination of *A. tumefaciens* was found (three weeks after co-cultivation) at 1.0 density. Moreover, in the same bacterial stain, co-cultivation time at the density of 0.5 showed significantly different of transgenic plant production (Figure 2). After 6-8 weeks of plant regeneration (Figure 3C, D), PCR analysis was performed to confirm the presence of *GUS* gene in the leaves and shoots (Figure 3E, F). The PCR reaction revealed the *GUS* fragment with expecting size of 500 bp in genomic DNA of each putative transgenic plant with antisense pBI121-*Ca-ACSI* (Figure 4). Transgenic plants with pBI121-*Ca-ACSI*, expressing high GUS activity, were further analyzed by Southern blotting technique using the *GUS* gene as a probe. Genomic DNA of the *S. speciosa*, was digested with *Hind*III, which was cut only one site within the introduced construct, produced single fragment in transformed plants (lane 2-8) and one of them showed multicopies of the transgene indicating that the foreign gene had been integrated into the genome of the putative transformed plants at difference insertion sites (Figure 5). The results obtained from our research also showed that the higher transformation efficiency was obtained when leaf explants were used and their phenotypic is under investigation.

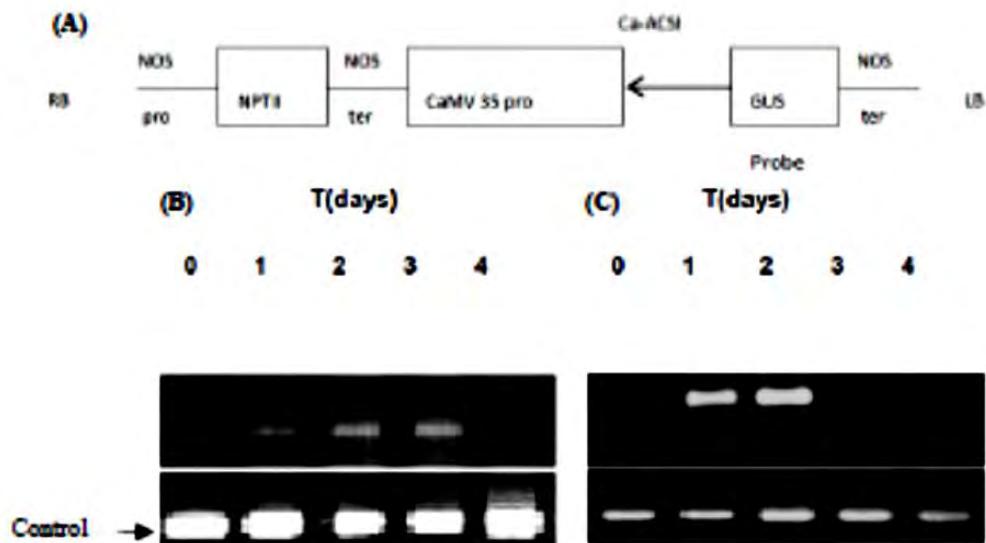
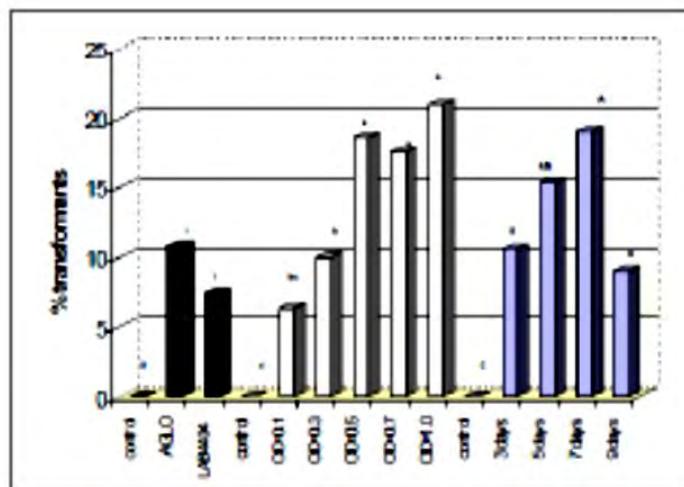
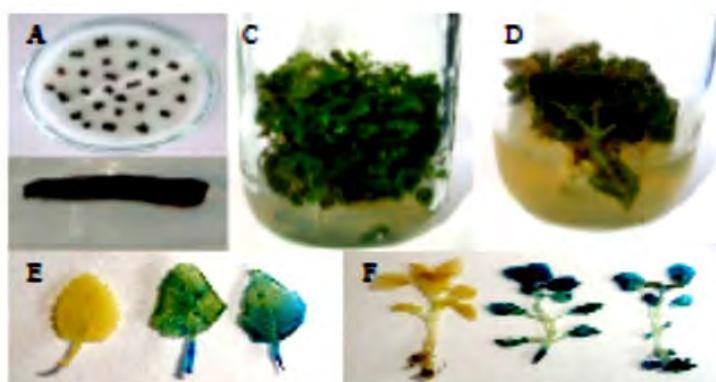


Figure 1. Schematic representation between two T-DNA regions of pBI121-Ca-ACSI (A). RB, right border of the T-DNA; LB, left border of the T-DNA; NOSpro, nopaline synthase gene promoter; NOSter, nopaline synthase gene terminator; CaMV 35S, 35S promoter from Cauliflower mosaic virus; *NPT II*, neomycin phosphotransferase gene; Ca-ACSI, antisense cDNA encoding ACC synthase gene from *C. alismatifolia* Gapnep.; GUS,  $\beta$ -glucuronidase gene. Expression analysis of ACC synthase and ACC oxidase gene; Ca-ACSI (B) and Ca-ACOI(C) in *C. alismatifolia* Gapnep. by RT-PCR ;T: time after postharvest of cut flower (days).



\*Significant different at  $p < 0.05$   
Mean followed by the same letter do not different significantly ( $p < 0.05$ ).

Figure 2. Transgenic plant with positive GUS gene (PCR and GUS assay) were presented with different condition.



Control pBI121 pBI121-Ca4CSI control pBI121 pBI121-Ca4CSI

Figure 3. Formation from culturing *Sinningia speciosa* tissues cultured on solid MS supplemented with hormones for 6 weeks (C) to 8 weeks(D) and histochemical GUS assay on transgenic. E: stable expression in leaf segments (right: transformed plant, left: non transformed plant). F: Transient expression of GUS gene on shoots at 8 weeks after cocultivation (right: transformed plant, left: non transformed plant). Scale bar on each picture represents 0.5 cm.

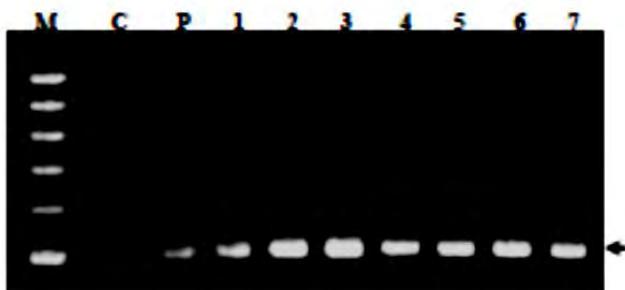


Figure 4. PCR analysis of *Sinningia speciosa* plants transformed with the *GUS* gene. M: Molecular marker 100 bp ladder; C: non-transformed plant; P: pBI121plasmid; 1: transformed plants with pBI121; 2-7: transformed plants with pBI121-*Ca-ACSI*. Arrow: expected 500 bp fragment of the *GUS* gene

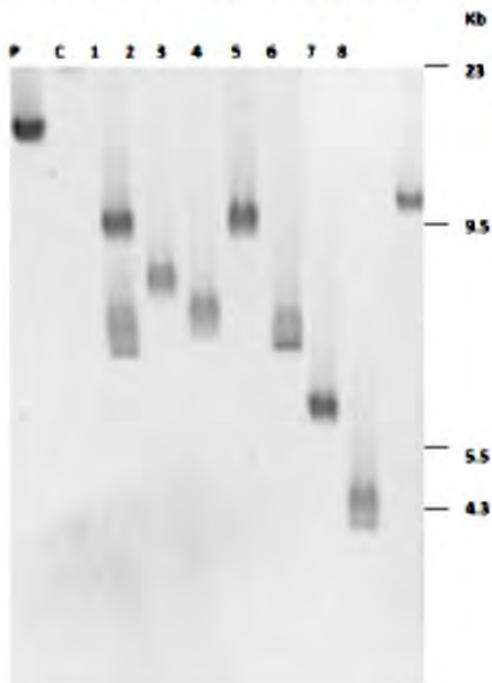


Figure 5. Southern blot analysis of putatively transformed *Sinningia speciosa* plants. 10  $\mu$ g DNA was hybridized with the *GUS* probe. Lane P: positive control (pBI121); Lane C: control plant (non transformed). Lane 1-7: transformed plants with pBI121-*Ca-ACSI*; 8 : transformed plants with pBI121.



### Acknowledgements

We wish to thank The Central of Laboratory, University of Phayao Research Fund, TRF, CHE (MRG5380221) and National Research Council of Thailand (NRCT).

### References

Adams, D.O. and Yang, S.F. 1979. Ethylene biosynthesis : identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* pp. 76:170-174.

Bunya-atichart, K., Ketsa, S. and Doorn van, W. G. 2004. Postharvest physiology of *Curcuma alismatifolia* flowers. *Postharvest Biol. and Technol.* 34: 219-226.

Borochov, A. and Woodson, W.R. 1989. Physiology and biochemistry of flower petal senescence. *Sic Hortic.* 11: 15-43.

Hagiladi, A., Umiel, N., Gilad, Z. and Yang, X.H. 1997. *Curcuma alismatifolia*. I. Plant morphology and the effect of tuberous root number on flowering date and yield of inflorescences. *Acta Hort.* 430: 747-754.

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

Mahadtanapuk, S., Topoonyanont, N., Handa, T., Sanguansermisri and M., Anuntalabhochai, S. 2006. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation in *Curcuma alismatifolia* Gagnep. By using retarded shoots. *Plant Biotechnology* 23: 233-237.

Mahadtanapuk, S., Nanakorn, W., Chandej, R., Sanguansermisri, M., Tera-arusiri, W. and Anuntalabhochai, S. 2010. Isolation and Expression Analysis of a Gene Encoding ACC Oxidase in *Curcuma alismatifolia* Gagnep. *Acta Hort.* 855: 189-194.

Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.* 15: 473-497.

Roh, M.S., R. Lawson, J.S. Lee, J.K. Suh, R.A. Criley and P. Apavatjrut. 2006. Evaluation of Curcuma as potted plants and cut flowers. *J. Hort. Sci. Biol.* 81(1): 63-71.

Roh, M.S. and R.H. Lawson. 1993. Curcuma. Grower Notebook. A step-by-step guide to success. *Greenhouse Manager.* 12: 10.



The 18th International Conference on Ion Beam Modifications of Materials (IBMM2012) will be held in Qingdao, China, from September 2nd to 7th, 2012. The IBMM is a major international forum to present and discuss recent research results and future directions in the field of ion beam and plasma-induced modification, synthesis, patterning and characterization of materials. The conference brings together physicists, materials scientists, ion beam specialists and those who are interested in the practical application of ion beams from all over the world. The focus of the conference is on the materials science involving both basic ion-solid interaction processes and property changes occurring either during or subsequent to ion bombardment and ion beam processing in relation to materials, biomaterials and device applications.

The official emails of IBMM 2012 are [bmm2012@sdu.edu.cn](mailto:bmm2012@sdu.edu.cn) and [bmm18@ysu.edu.cn](mailto:bmm18@ysu.edu.cn). Please note that [bmm2012@gmail.com](mailto:bmm2012@gmail.com) is NOT our email. Please ignore emails sending from this address (if there are some.)

The official language of IBMM 2012 is English.

The Abstract Submission was closed. We thank all the colleagues for their contributions for IBMM 2012.

**Conference Program.** [Download](#).

**General Information (New!).** [Download](#).

#### Important Dates

First announcement	October 2011
Notification to authors	January 2012
Abstract deadline	16-April-2012 21 April 2012 (Closed)
Opening of the early registration	16 May 2012
Early registration deadline	06-July-2012-15-July 2012 (Closed)
Manuscript submission deadline	30 September 2012

Contact us:  
School of Physics,  
Shandong University  
Jinan 250100, P.R. China

Email:  
[IBMM2012@sdu.edu.cn](mailto:IBMM2012@sdu.edu.cn)  
[ibmm18@gmail.com](mailto:ibmm18@gmail.com)

Phone:  
+86-531-88363350  
Fax:  
+86-531-88363350

#### IBMM2012 Best Poster Award

Students are the hope of future research. Many students will attend the IBMM 2012 and present their results in posters by themselves. There will be two poster sessions during the conference. Among these presentations, we believe that some of them are really very excellent and the presenters should be encouraged.

Hereby we are pleased to announce IBMM 2012 "Best Poster Award" for student participants who present their posters by themselves during the IBMM 2012. The "student participants" must be graduate students, i.e., master students or PHD students. Postdoctoral researchers are not included, which is a tradition of most conference series. The student participants who want to apply for such awards will be asked to make marks above their posters during the session. The IBMM staff will prepare small paper marks for the candidates before the poster session. Up to 10 awardees will be selected by an Expert Committee consisting of well-known scientists.

The winners for Best Poster Award will receive a Certificate issued by the Chairman of IBMM 2012 and a Grant for attendance on the conference banquet and conference tour free of charge (the fee for conference banquet and conference tour will be refunded if the winners prepay it). The winners of this award will be announced during the Conference Banquet on Thursday evening.

We encourage and welcome all the student participants who will present their posters by themselves during IBMM 2012 to be candidates for the Best Poster Award!

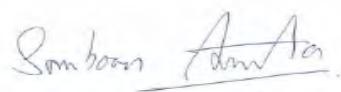
#### Conference Topics

เอกสารแนบท้าย  
การตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ  
(อยู่ระหว่างการส่งไปยังวารสาร)

**18th International Conference on  
Surface Modification of Materials by Ion Beams (SMMIB)**

**AUTHOR'S CERTIFICATION**

This is to certify that I have obtained the necessary authorization for publication of the enclosed paper in the Proceedings of the 18th International Conference on Surface Modification of Materials by Ion Beams (SMMIB) and in *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*. and that the paper is original and unpublished and is not being considered for publication elsewhere. (The only exception are invited papers which have been clearly identified as review articles).



**(Signature) Corresponding Author**

**Somboon Anuntalabhochai**  
Printed Name

**Department of Biology,  
Chiang Mai University, Chiang Mai  
50200, Thailand  
Organization**

**4 th September 2012  
Date**

## **SURFACE AND COATINGS TECHNOLOGY (SCT)**

### **MANUSCRIPT REPORT FORM**

**(Author type or print information between lines;  
return two copies with revised paper)**

**Presentation No. (refer to SMMIB final program) ;**

**Type of Paper ;      Invited,      contributed**

---

**Title of Paper: Cloning and Transformation of Gene Involving in Flower Senescence-Associaion from *Curcuma alismatifolia* Gagnep. by Application of Low-Energy Ion Beam**

**Corresponding author: Somboon Anuntalabhochai**

**Full Mailing Address:      Department of Biology, Chiang Mai  
University, Chiang Mai  
50200, Thailand**

**Telephone: 66-053-943346**

**Fax: 66-350-640049**

**e-mail: burinka@hotmail.com**

**Keywords: Ion beam bombardment, transformation, ACC synthase,  
cloning**

---

**Date Received: 18th September 2012**

**Revised Received Date:**

**Date Accepted:**

## **Cloning and Transformation of Gene Involving in Flower Senescence-Association from *Curcuma alismatifolia* Gagnep. by Application of Low-Energy Ion Beam**

S. Mahadtanapuk<sup>(1)</sup>, W. Teraarusiri<sup>(1)</sup>, M. Sanguansermsri<sup>(2)</sup>, W. Nanakorn<sup>(2)</sup>, L. D. Yu<sup>(3)</sup> and S. Anuntalabchchai<sup>(4)</sup>

<sup>(1)</sup>*School of Agriculture Natural Resources and Environment, University of Phayao, Tumbol Maeka, Muang, Phayao, 56000, Thailand,*

<sup>(2)</sup>*University of Phayao, Tumbol Maeka, Muang, Phayao, 56000, Thailand*<sup>2</sup>,

<sup>(3)</sup>*Fast Neutron Research Facility, Department of Physics, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand*

<sup>(4)</sup>*Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand*<sup>4</sup>

**Corresponding Author: Somboon Anuntalabchchai (phone): 66 053 943346, (Fax):66 054 466 663**

**(e-mail):burinka@hotmail.com**

### **Abstract**

In this paper we present a novel method to induce gene transfer in plant using a low-energy ion beam. Aim of this work was to suppress an expression of ACC synthase gene in Siam tulip, *Curcuma alismatifolia* Gagnep. An cDNA fragment encoding ACC synthase from *C. alismatifolia* Gagnep. was isolated and its expression was analyzed. To determine the expression of pCa-ACSI, the northern blot analysis and RT-PCR was used for gene analysis by specific primer. The result showed that the pCa-ACSI gene was detected in bract of curcuma and the highest expression was observed at 2 days after flower was cut. The Ca-ACSI was subcloned pBI121 resulting in pBI121-Ca-ACSI, then transformed into model plant (*Torenia fournieri*) by application low-energy ion beam at an energy of 28–50 keV with a fluence range of  $10^{14}$ – $10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>. After this treatment, the transgenic plantlets were confirmed by PCR analysis and a histochemical GUS assay. Highly efficient of transformant

tissue was showed as a method to plant transform with application low-energy ion beam bombardment.

## Keywords

Ion beam bombardment, transformation, ACC synthase, cloning

### 1. Introduction

Flower longevity is one of the most important characters of ornamental plants and extension of the longevity is a major target for improving the flower quality. Generally, the cause of short vase life is influenced by ethylene in many ornamental plants[1]. Ethylene, a gaseous major phytohormone, is one of the simplest organic molecular that exhibit biological activity. The biochemistry of ethylene biosynthesis has been a subject of intensive study in plant hormone physiology [2]. In the ethylene synthesis pathway were the establishment of S-adenosylmethionine (SAdoMet) and ACC as the precursors of ethylene [3]. On the basis of the pathway, the first committed step of ethylene biosynthesis is the conversion of SAdoMet to ACC by ACC synthase (Sadenosyl-L-methionine methylthioadenosine-lyase, EC4.4.14) [4]. In addition to ACC, ACC synthase (ACS) also produces 5-methylthioadenosine (MTA) in this reaction, which is then converted to methionine by using a modified methionine cycle [5]. Finally, ACC is oxidized by ACC oxidase (ACO) to form ethylene.

On the basis of this knowledge, the enzymes that catalyze these reactions were characterized and purified using biochemistry approaches. The first successes in molecular cloning of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase gene [6] and ACC oxidase (ACO) genes led to the demonstration that these enzymes belong to a multigene family [7]. Since then, ACC synthase has been isolated and its expression analyzed from many plants [8], such as winter squash, pear, apple, banana, and carnation. Further, the endogenous plant genes can be inhibited very effectively by antisense genes. This was shown

Aida et al [9] who used an *ACC oxidase* antisense gene to inhibit ethylene production in the flower petals of transgenic torenia plants. These results indicate the general feasibility of down-regulating ethylene synthesis. It seems likely that, if the production of ethylene can be reduced further, it may be possible to delay senescence process in transgenic plants. In addition, the introduction of ACC synthase gene, or ACC oxidase gene [10] by antisense technology caused reduction of ethylene production and a delay of flower senescence [11]. Therefore our hypothesis is that the suppression of the genes involving in ethylene biosynthesis that regulate flower senescence of curcuma might extend its flower longevity.

To understand the molecular functions of ACC synthase genes in Curcuma and to mean ethylene production knockout by recombinant technique, cloning and expression of ACC synthase genes are essential for anti-senescence or gene silencing technique that reduces ethylene production, ultimately enhancing the storage life and quality of the harvested products. Moreover, the new technique of transformation into plant tissue by application of low-energy ion bombardment has presented.

## **2. Experimental**

### *2.1 Plant materials*

Curcuma (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.) were obtained from the Chiang Rai Horticultural Research Center. The curcuma var. Chiang Mai Pink was grown under the greenhouse condition and used for RNA preparation.

### *2.2 RNA isolation, Cloning, and Sequencing*

Total RNA from fresh Curcuma (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.) flowers was extracted by using RNeasy® Mini Handbook (QIAGEN). The RNA was used as template for reverse transcriptase (RT-PCR), degenerate forward and reverse primers were designed from

highly conserved domains of ACC synthase sequences such as TNPSNPLGTT (F1) , PGWFRVCFAN (R1) and HIVYSLSKDL (R2) (forward primer1 : 5'PAC IAA YCS ITC IAA YCC ICT IGG IAC , reverse primer1 : 5' CG(CT) TT(AG) TG(ACGT) G(GT)(CT) TTG GT, reverse primer2 : 5'PCC IAC ICK RAA ICC IGG for ACC synthase. The amplified cDNAs were ligated into pGEM T-easy plasmid and named pGEM-Teasy-*Ca-ACSI* . Plasmid vectors that positive hybridized with ACC synthase gene were sequenced by BSU (Bio Service Unit), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Bangkok, Thailand. Plasmid DNA was prepared for sequencing using the Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer) and following manufacturer's instructions. The sequences obtained were analyzed with the Genome Net (NCBI) database and the fragments for ACC synthase named *Ca-ACS I*.

### 2.3 Northern blot analysis

Total RNA isolated different organs (petal, bract, stem, and leave) and bracts after postharvest of cut flower were run on formaldehyde agarose gels (20  $\mu$ g per lane). RNA was transferred to nylon membranes (Roche) with 20x SSC and the blots were baked by UV light. For probe preparation, a cDNA of ACC synthase named *Ca-ACSI* from pGEM-Teasy were digested with *Eco*RI and labeled with DIG High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II (Roche) as probes. Hybridization and detection procedures were performed as described by manufacture. The prehybridization was performed for 3 hr at 68 °C in a solution containing 5x SSC, 50% formamides, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02% SDS, and 2% blocking reagent (Roche). Hybridization and detection procedures were performed as described by manufacture (Amersham Pharmacia Biotech).

### 2.4 Plant Transformation

To prepare the plant tissue for transformation by ion beam bombardment, Leaf tissues of *Torenia founieri* from tissues culture were cut with 0.5x0.5 cm. of size. Then the explants were transferred on a sterile adhesive tape which was attached to a Petri dish and then placed inside a sample holder. The holder was capable of sequentially exposing a number of samples to the ion beam, as well as housing the unbombarded control sample. Ion bombardment was carried out using the bioengineering applicable ion-implantation facility at Chiang Mai University. Nitrogen ions were chosen for ion bombardment in the energy range of 28–50 keV with a fluence range of  $10^{14}$ – $10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>. Inside the target chamber the temperature of the target was about 0 °C as both low ion flux and water cooling was used. The samples were maintained under these conditions for about 1.5–2 h, allowing for system pump-down and ion bombardment.

After implantation, the sample was immediately incubated at 25 °C in a shaker incubator with Murashige and Skoog medium (MS medium) containing 1 ug/ml of plasmid DNA for 30 min. Then the explants were cultured in vitro as described by Mahadtanapuk et al. [12] and transferred onto regeneration medium containing 100 mg/L kanamycin. The explants were subcultured every 2 weeks. After that transformants were detected according PCR and GUS assay were used to confirm the transformation. The histochemical GUS assay was conducted as described by Jefferson et al. [13].

### 3. Results and Discussion

For suppression of the genes involving in ethylene biosynthesis, the partial of ACC synthase was cloned by RT-PCR method. After sequencing, the cDNA of 645 bp contains an open reading frame encoding 215 amino acids. A homology search was performed using the BLAST program (NCBI). The analysis demonstrated that the amplified fragment encoded for part of the ACC synthase gene. When the sequence of the fragment was compared the ACC

genes in databases by Phylogeny PhyML program, *Ca-ACSI* had a high sequence similarity (69-74%) to *Musa acuminata*, *Cymbidium* sp., *Vigna radiata*, *Citrus sinensis*, *Pelargonium hortorum*, Petunia and *Nicotiana tabacum* ACC synthase genes (Fig. 1). To determine the most significant ACS gene related to senescence in curcuma, northern analysis was performed with mRNA from different time points at postharvested curcuma. In Fig. 2., only signals for the *Ca-ACSI* gene were detected in the bracts of curcuma. The *Ca-ACSI* was expressed during postharvest in bracts at 2 days after cutting the flower. This result was related to the respiration and the ethylene production of open florets increased as they approached senescence. In bract of bloom curcuma results in an increase level of respiration and ethylene production from 2 to 4 day after harvesting and the prominent indication for the termination of vase life was the brown of the tip of coma bract or bract [14].

To manipulate these genetically-engineered plant tissue, the techniques in transformation or gene delivery are needed. Therefore, a model plant (*Torenia fournieri*) was used for gene transformation. Consequently, *Ca-ACSI* was subcloned in pBI121 resulting in pBI121-*Ca-ACSI*, and transformed into leaf tissues of *T. fournieri* by application of ion beam bombardment (Fig 3A). Six weeks after bombardment (Fig 3C,D), 12 and 14% explants of 50 shoots from *T. fournieri* transformed by pBI121 and pBI121-*Ca-ACSI* respectively, showed positive GUS gene. The transformation frequency was evaluated by histochemical GUS activity and PCR analysis (Table1). The PCR reaction revealed the presence of the GUS fragment with expected size of 500 bp in genomic DNA of each putative transgenic plant (Fig. 4). The prominent GUS activity was found in leaves and stems of the transformed plantlets with high expression in explants transformed with pBI121-*Ca-ACSI* (antisense) and pBI121 by using application low-energy ion beam at an energy of 30 keV with a fluence range of  $10^{15}$  ions/cm<sup>2</sup> (Fig. 5).

In the knowledge of, the *Curcuma* is a monocotyledonous plant species. To

introduce desirable traits by a gene transformation system, an efficient regeneration protocol is essential in *Curcuma*. The most important prerequisite for the method is the possibility to regenerate plants from callus tissues or explants, although comparative data, concerning tissue propagation and regeneration of *Curcuma* tissue, is very rare. In recent years, the *Agrobacterium*-mediated transformation for *Curcuma alismatifolia* Gagnep. has been reported by Supuk et al [12] and their transformation frequency was about 15%. In our transformation experiments, we report here the first transformation evidence of ACS gene from *C. alismatifolia* Gagnep. into *T. fooumieri* by application of ion beam bombardment. This establish, the transformation efficiency was calculated, based on the number of transgenic plants recovered by the number of the original intact shoots, the transformation frequency with pBI121 and pBI121-*Ca-ACSI* was approximately 2-14%. Moreover the antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase gene isolated from *C. alismatifolia* was tried to introduce by this method, in an attempt to prolong vase life of the inflorescence after harvesting.

## 5. Conclusions

In this study we investigated the role of ACC synthase in curcuma by cloning cDNA and examining expression patterns of the genes. We have investigated the effects of wounding, organ difference, and postharvest of cut curcuma. The expression of curcuma ACC synthase gene (*Ca-ACSI*) was specifically in bracts and the high expression of the *Ca-ACSI* at 2 day after harvesting might be involved in vase life and the low ion beam bombardment at an energy of 30 keV with a fluence range of  $10^{14}$ – $10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup> can induct gene transformation in *Torenia fooumieri*

## **Acnowledgments**

We wish to thank The University of Phayao and TRF, CHE (MRG 5380221) for supporting

## **References**

- [1] A. Borochov, W.R. Woodson, *Sic Hortic.* 11 (1989) 15-43.
- [2] X. Liang, S. Abel, J.A. Keller, N.F. Shen, A. Theologis, *Proc Natl Acad Sci USA.* 89(1992) 11046–11050.
- [3] S.F. Yang, N.E. Hoffman, *Annu Rev Plant Physiol.* 35 (1984) 155–189.
- [4] H. Kende, *Annu Rev Plant Physiol.* 44(1993) 283–307.
- [5] A.B. Bleecker, H. Kende, *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16 (2000) 1–18.
- [6] T. Sato, A. Theologis, *Proc Natl Acad Sci USA.* 86 (1989) 6621–6625.
- [7] P. Spanu, D. Reinhardt, T. Boller, *EMBO J.* 10(1991) 2007–2013.
- [8] C.S. Barry, M.I. Llop-Tous, D. Grierson, *Plant Physiol.* 123(2000) 979–986.
- [9] R. Aida, T. Yoshida, K. Ichimura, R. Goto, M. Shibata, *Plant Sci.* 138 (1998) 91-101.
- [10] A.J. Hamilton, G.W. Lycett, D. Grierson, *Nature.* 346 (1990) 284-287.
- [11] K.W. Savin, S.C. Baudinette, M.W. Graham, M.Z. Michael, G.D. Nugent, C.Y. Lu, *Sci Hortic.* 30 (1995) 970-972.
- [12] S. Mahadtanapuk, N. Topoonyanont, T. Handa, M. Sanguansermsri, S. Anuntalabchchai, *Plant Biotech.* 23(2006) 233–237.
- [13] R.A. Jefferson, T.A. Kavanagh, M.W. Bevan, *EMBO J.* 6(1987) 3901–3907.
- [14] K. Bunya-Atichart, S. Ketsa, W.G. Doorn van, *Postharvest Biol.* 34(2004) 219–226.

## **Figure Captions**

Fig.1. The sequence of the fragment was compared the ACC genes in databases by Phylogeny PhyML program, *Ca-ACSI* had a high sequence similarity (69-74%) to *Musa acuminata*, *Cymbidium sp.* *Vigna radiate*, *Citrus sinensis*, *Pelargonium hortorum*, *Petunia* and *Nicotiana*

*tabacum* ACC synthase genes.

Fig.2. Expression analysis of curcuma ACC synthase gene (*Ca-ACSI*) by Northern blotting on total RNA from different organ; L: Leaves, S: Stem, B: Bract, Pe: Petal and P: Bracts after postharvest of cut flower.

Fig. 3. Plasmid DNA was transformed into leaf tissues of *Torenia fournieri* by application of ion beam bombardment; A: the preparation of the plant tissue for transformation by ion beam bombardment, B: the explants were cultured in vitro and transferred onto regeneration medium, C: the transformants at six weeks of age.

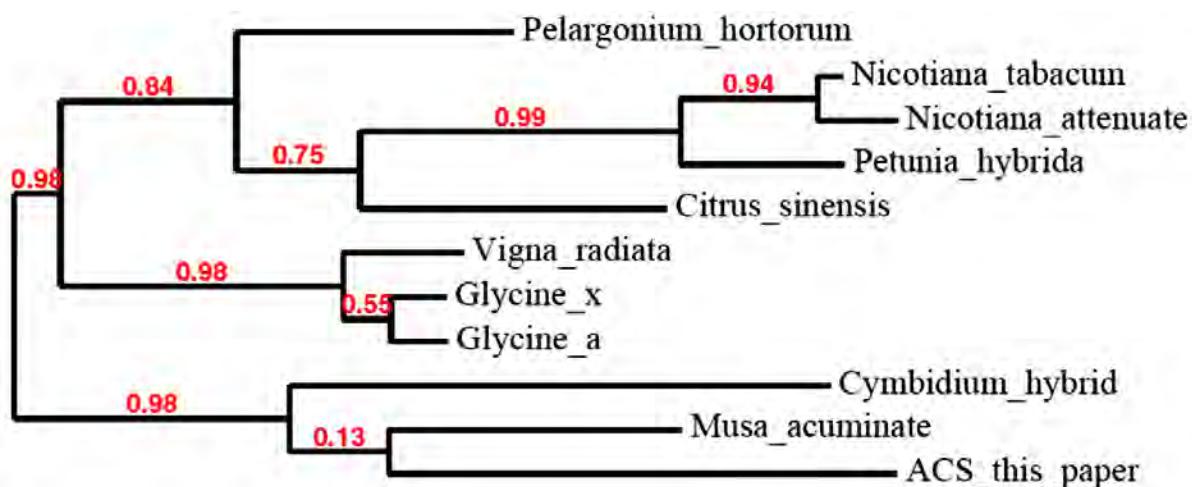
Fig. 4. PCR amplification; *Pst*I molecular size marker: 1, plasmid pBI121: 2, plant transform with plasmid pBI121: 3, plant transform with plasmid pBI121-*Ca-ACSI*: 4, non-transformed plant: 5. Arrow indicates the PCR products of expected size after GUS gene amplified (500 bp).

Fig. 5. Histochemical observation, shoots 6 weeks after transformation; non-transformed plant (A), plasmid pBI121(B), plasmid pBI121-*Ca-ACSI* (C).

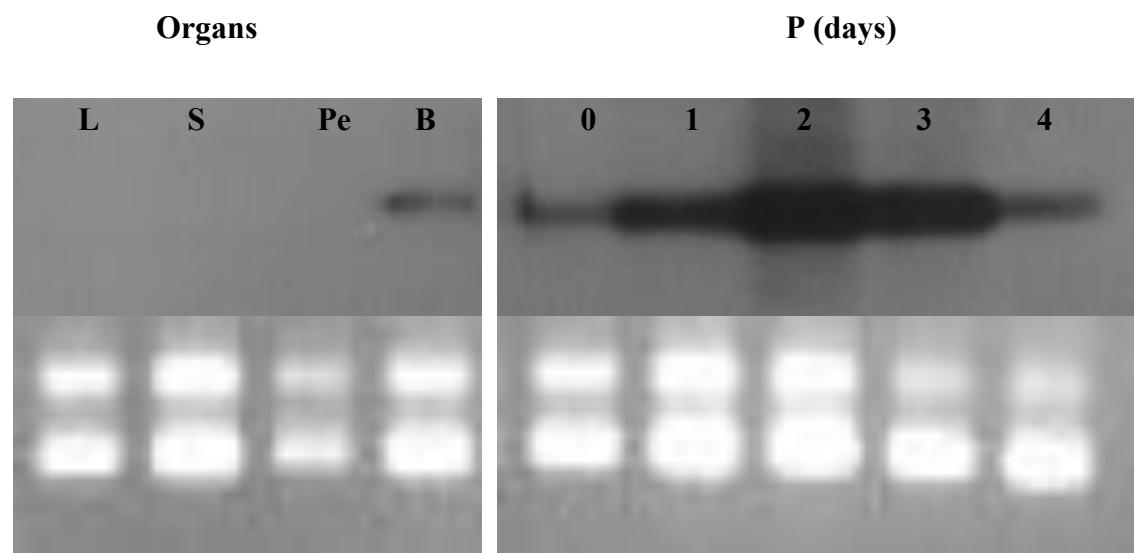
Table 1. Transformation and selection ratio in transgenic plant.

Application low-energy ion beam at an energy of 30 keV with a different fluence range	Percentage of explants showing <i>GUS</i> spots (%)		Frequency of transformed shoot showing positive PCR	
	pBI121	pBI121- <i>Ca-ACSI</i>	pBI121	pBI121- <i>Ca-ACSI</i>
10 <sup>14</sup> ions/cm <sup>2</sup>	2	4	8	8
10 <sup>15</sup> ions/cm <sup>2</sup>	4	6	12	14
10 <sup>16</sup> ions/cm <sup>2</sup>	0	4	6	12

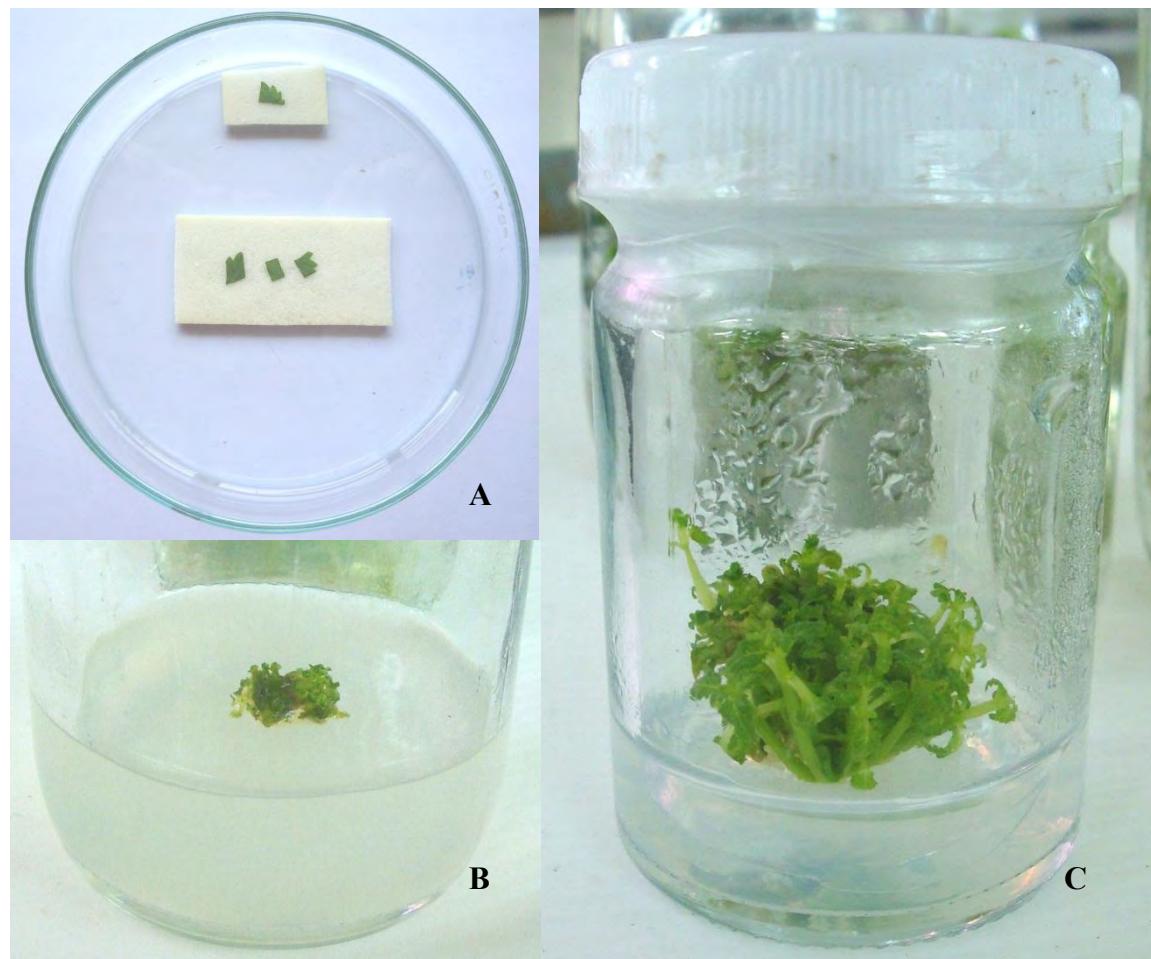
Figure 1



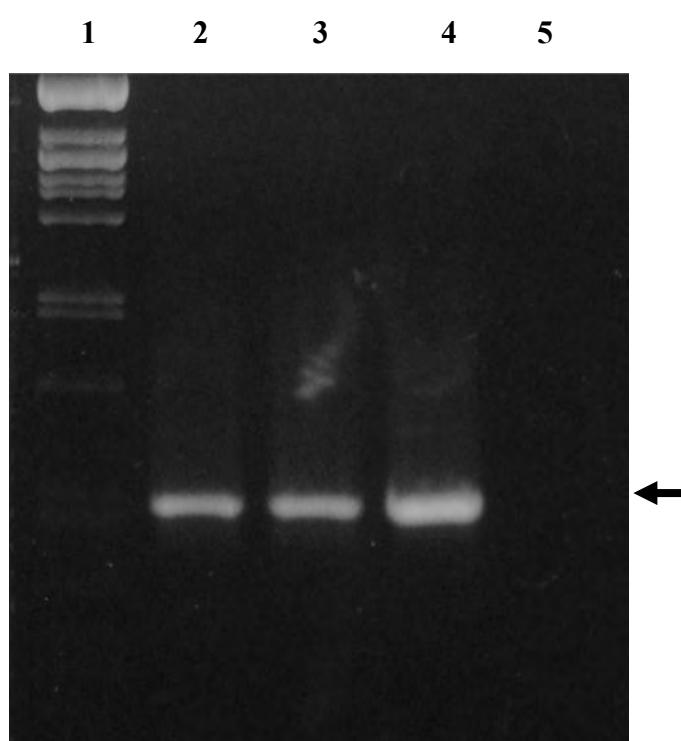
**Figure 2.**



**Figure 3.**



**Figure 4.**



**Figure 5.**



**A Novel Identification of Thioredoxin Reductase Gene Involved in  
Bacterial Antagonism to Fungal Infection of Ornamental Crops Assisted by  
Ion Beam Mutation**

S. Mahadtanapuk<sup>a</sup>, W. Teraarusiri<sup>b</sup>, W. Nanakorn<sup>c</sup>, L. D. Yu<sup>d,e,\*</sup>

and S. Anuntalabchchai<sup>f,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Tumbol Maeka,  
Muang, Phayao 56000, Thailand

<sup>b</sup> University of Phayao, Central Laboratory, Tumbol Maeka, Muang, Phayao 56000, Thailand

<sup>c</sup> The Crown Property Bureau, 173 Nakhonratchasrima Road, Dusit, Bangkok 10300,  
Thailand

<sup>d</sup> Plasma and Beam Physics Research Facility, Department of Physics and Materials Science,  
Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

<sup>e</sup> Thailand Center of Excellence in Physics, Commission on Higher Education,  
328 Si Ayutthaya Road, Bangkok 10400, Thailand

<sup>f</sup> Molecular Biology Laboratory, Department of Biology, Faculty of Science,  
Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

\* Corresponding Authors:

Email: [yuld@fnrf.science.cmu.ac.th](mailto:yuld@fnrf.science.cmu.ac.th) (L.D. Yu), [soanu.1@gmail.com](mailto:soanu.1@gmail.com) (S. Anuntalabchchai)

Tel.: +66 53 943379, Fax: +66 53 222776

Postal address: Plasma and Beam Physics Research Facility, Department of Physics and  
Materials Science, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

## Abstract

*Bacillus licheniformis* (*B. licheniformis*) is a common soil bacterium with an antagonistic effect on *Curcuma alismatifolia* Gagnep. In an attempt to control fungal diseases of local *Curcuma* by utilizing *B. licheniformis*, we carried out gene analysis of the bacterium to understand the bacterial antagonistic mechanism. The bacterial cells were bombarded to induce mutations using nitrogen ion beam at energy of 30 kilo-electron-volts (keV) with fluences in the range of  $10^{14}$ – $10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>. After ion beam bombardment, a HAT-RAPD (high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA) scan revealed that the modified polymorphism fragment present in the wild type was missing in a bacterial mutant which lost the antifungal activity. These polymorphic bands were then subcloned into a pTZ57R/T plasmid and sequenced. One of the fragments conserved in the wild type and lost in the mutant bacteria was identified to code for the thioredoxin reductase (*TrxR*) gene. The RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) gene analysis result showed that the *TrxR* gene from *B. licheniformis* had the expression of the antagonism to fungi in a synchronous time evolution with the fungus inhibition when the bacteria were co-cultivated with the fungi. The collective results indicate the *TrxR* gene responsible for the antagonism of bacteria *B. licheniformis* to fungal infection.

**Keywords:** Ion beam bombardment, Mutation, Thioredoxin reductase (*TrxR*), Bacterium, *Bacillus licheniformis*, Fungus, Antagonism.

## 2. Introduction

*Colletotrichum* is a large genus of Ascomycete fungi containing species that are amongst the most successful plant pathogenic fungi. These fungi can cause significant economic damage to crops in tropical, subtropical, and temperate regions (Mills, 1992). The current method to protect against this disease has been through the application of synthetic fungicides, but alternative methods to combat this disease could potentially be less harmful to human health and the environment (O'Brien, 1989). One such method has already achieved considerable success utilizing antagonism (McLaughlin, 1992), in which naturally occurring nonpathogenic microorganisms reduce the activity of plant pathogens and thereby suppress diseases. The antagonistic microorganisms can compete with pathogens for nutrients and hence inhibit pathogen multiplication by secreting antibiotics or toxins, or reduce pathogen population through parasitism. Moreover, some of these microorganisms can induce generalized resistance in plants, which enables the plant hosts to better defend themselves against pathogens (van Loon, 2000).

*Bacillus* spp., a potential antagonistic bacterium, has been applied to control anthracnose in many plants (Jeffries, 2000). Being pervasive in most soils, *Bacillus* spp. is highly thermally tolerant, capable of rapid growing in liquid culture and easy forming resistant spores, hence it is considered to be a safe biological agent. Therefore, the use of this bacterial species shows great potential in being as a biocontrol agent (Siala, 1974). However, the mechanism by which it can suppress plant pathogens has not been extensively investigated. In this study, we developed a novel way to identify gene involved in the bacterial antagonism to the fungal infection of ornamental crops by using low-energy ion beam bombardment of *Bacillus* spp. bacteria to induce mutation and screening useful

phenotypes which could be used for gene selection and cloning in order to investigate the antagonistic property of *Bacillus licheniformis* on Anthracnose, a disease caused by *Colletotrichum musae* (*C. musae*) in *Curcuma alismatifolia* Gagnep. (Mahadtanapuk, 2003).

Low-energy ion beams have been developed for biotechnology applications (Yu, 2006). The key component in ion beam biotechnology is the use of energetic charged particles to produce radiation damage in biological matter. The ion-beam-induced radiation damage acts as a new mutagenic source for genetic modification of organisms. The generation and application of low-energy ion beams are inexpensive and technically easier, especially in small scale laboratories and developing countries. It has been reported that low-energy ion beams can produce biological effects as significant as using high-energy ion beams, and therefore, research into low-energy ion beam biotechnology has shown recently rapid growth (Yu, 2006; Feng, 2007; Yu, 2007; Yu, 2010). One important application of ion beam biotechnology is the induction of mutations in biological objects including rice (Yu, 1991; Phanchaisri, 2007), flowers (Yamaguchi, 2003) and bacteria (Xie, 2004). Ion beam bombardment can induce a broad spectrum of mutations and treat a large number of biological targets simultaneously. The intended effect of the induced mutations is generally to create improved biological samples. However, in this work, we used ion-beam-induced mutation for gene identification. Bacterial cells of *Bacillus licheniformis* (*B. licheniformis*), obtained from hot springs in Chiang Mai, having ability to suppress the fungal growth were bombarded by nitrogen ion beam. Genetic alteration of the bombarded bacteria caused them to lose their antagonistic property. Thus, the change in phenotype was then investigated using the high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique (Anuntalabhochai, 2000). The difference in the fingerprint profiles between the bombarded bacteria and the wild type was analyzed to find the gene involved in the antagonistic activity.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Media and culture conditions

The plant disease fungi, *C. musae*, initially isolated from *Curcuma alismatifolia Gagnep.* bract (Fig. 1 A and B), were routinely subcultured onto potato dextrose agar (PDA) (Mahadtanapuk, 2007). The fungal isolation was following the standard fungi isolation procedures (Agrios, 2005). The diseased tissues of curcuma were collected from a local farm and returned to the laboratory. The disease symptoms were examined and the casual agent isolated and identified under microscope. The diseased curcuma was cut into small pieces (3-5 mm). Each piece of the tissue was sterilized by dipping in 10% Clorox for 3-5 min and washing in 2 or 3 series of sterile water, and then placed separately on PDA plates. The plates were incubated at room temperature (28-30°C) and observed periodically. The growing edges of colonies developing from the leaf disks were then transferred aseptically to cornmeal agar slant. The fungi were stored at 4°C and cultured on slants of PDA. The *B. licheniformis* strain with highly antagonistic activity against fungal diseases on *C. alismatifolia Gagnep.* and thermo-tolerance was isolated from local hot springs in Sankampaeng, Chiang Mai, Thailand. Typical colonies of the isolates were streaked on lysogeny broth (LB) medium and selected for storage at 4°C. The bacteria were tested to demonstrate the antagonistic activity in dual culture (Skidmore and Dickinson, 1976) (Fig. 2A) and on plants as well (Fig. 1 C and D). In the dual culture, the bacteria and pathogenic fungi were inoculated dually on PDA medium in petri dishes 2-2.5 cm apart. The inhibition of actively growing fungi by the bacteria on PDA plates was quantified as the fungal radial growth distance perpendicular to the bacteria in centimeters. The inhibition percentage of the growth of the fungi was obtained using the formula:

$$100 \times (R1 - R2) / R1 \text{ [or, } = 100 \times (1 - R2/R1)], \quad (1)$$

where  $R1$  was the furthest radial growth distance of the fungus in control (or without the antagonistic bacteria) and  $R2$  was the radial growth distance of the fungus in dual culture with the antagonistic bacteria (Royse and Ries, 1977). It can be seen from eq. (1) that the longer the  $R1$  and/or the shorter the  $R2$ , the higher the inhibition. The cultures were incubated at room temperature, and growth of the fungi towards and away from the bacteria was allowed for 5, 7, and 10 days after incubation. After the test, the bacteria were cultured on slants of LB medium at 4°C for use in the mutation induction by low-energy ion beam bombardment.

## **2.2 Ion beam bombardment and median lethal dose (LD50) determination**

For the median lethal dose (LD50) determination, one loop of cells of *B. licheniformis* was transferred into 100 ml of LB medium [Trypton (10 g), yeast extract (5 g), NaCl (5 g), water (1 liter)] in a 500-ml flask. 18-g agar was added to the medium for 1 liter of LB agar medium. The culture was then incubated for 24 h at 37°C in a shaker with a rotating speed of 120 rpm. The cells of *B. licheniformis* were centrifuged to precipitate the cells and then spread as a single-cell layer on a sterile adhesive tape which was attached to a Petri dish and then placed inside a sample holder. The holder was capable of sequentially exposing a number of samples to the ion beam, as well as housing samples as vacuum control which was not exposed to ion beam but kept in the same vacuum environment for the same time as the samples under ion bombardment. Ion beam bombardment was carried out using the bioengineering ion beam facility at Chiang Mai University (Fig.3). The technical details of the ion beam facility have been described elsewhere (Yu, 2007). In brief, the facility uses a low-energy ion beam (maximum accelerating voltage of 30 kV), with a vertical setup for

convenient holding of the biosamples, double beam steering to avoid neutral particle contamination, a small target chamber to reduce evacuation time and *in-situ* atomic force microscope equipment. In the experiment, nitrogen (N) ions were used for ion irradiation with energy of 30 keV and fluences in the range of  $10^{14} - 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup> at a normal ion flux of an order of 10<sup>13</sup> ions/cm<sup>2</sup>/sec. This flux level was shown to be low enough to maintain the cells survival (Yu, 2006). The bacterial cells were bombarded in vacuum with a pressure of 10<sup>-4</sup> Pa, which led to the target temperature of about 0°C. Bacterial cells have been demonstrated to be able to survive in vacuum during ion bombardment for a certainly long time period of some hours (Yu, 2006).

After ion beam bombardment, the samples under each condition, including the control, were separately washed down with 10-ml LB solution and centrifuged for 1 min at 9000 rpm. The precipitates were resuspended in 5 ml of LB medium and incubated for 30 min at 37°C on a rotating shaker at a speed of 220 rpm until the optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) reached 0.3 to 0.6. These cell suspensions were subsequently 10-fold diluted to form samples at concentrations ranging from 10<sup>-1</sup> to 10<sup>-11</sup> and grown on solid LB medium. All culture plates were then incubated for 1 day at 37°C to ensure cell viability, which was shown by observed living cells. Then the number of cells for the same dilution of different fluences was counted and compared with the number of the control cells to determine the survival frequency, provided that all cells had the same division rate in the same dilution. Bacterial mutants were screened for the phenotype which lost their antagonistic ability against the fungi to be further tested. The mutant screening was operated using the dual culture method as mentioned above (Fig. 2).

### **2.3 DNA fingerprint determination**

Genetic alteration in terms of the fingerprint of the ion-bombarded bacteria was detected by HAT-RAPD, more than 30 arbitrary RAPD primers (QIAGEN OPERON, USA) were used in PCR amplification. The HAT-RAPD technique used an increased annealing temperature in polymerase chain reaction (PCR) up to 46°C, resulting in greater polymorphism, reproducibility and high resolution (Anuntalabchchai, 2000). The PCR was performed in a total volume of 20 µl containing:

- 10 × PCR buffer (Tris-HCl 100 mM, pH8.3, KCl 500 mM)
- 100 µM each dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
- 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0.2-0.4 µM primer
- 0.5 unit of Taq DNA polymerase
- 20 ng of DNA template

Reaction tubes were placed in Perkin-Elemer thermal cycle (Gene Amp PCR system 2400) and the following cycling profile was used: 95°C for 2 min, then 95°C for 30 sec for denaturation, 46-48°C for 30 sec for annealing, 72°C for 45 sec for extension, totally 35 cycles, and finally, 72°C for 5 min. After the thermal cycling program was completed, the amplification samples were stored at 4°C for electrophoresis.

#### ***2.4 Cloning and sequencing of the gene***

From the HAT-RAPD fingerprint, the polymorphic fragment, which was missing in the mutant with an absence of DNA bands in a comparison between the mutant bacteria and wild type bacteria, was reamplified by PCR. The PCR product was electrophoretically resolved on a 1% (w/v) agarose gel, and the appropriate DNA fragment recovered with an Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche, Germany). The purified DNA fragment was ligated into a

pTZ57R/T plasmid system, according to the manufacturer's recommendations, transferred into *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 $\alpha$  competent cells, and the bacterial cells were plated on LB agar plates containing 100  $\mu$ g/ml ampicillin. A clone containing the correct insert was identified by restriction enzyme analysis, denoted as pTZ57R-*Trx1*. The nucleotide sequence of the pTZ57R-*Trx1* was conformed to *B. licheniformis* (*trx* gene) by the sequencing method. After that the full length of *trx* gene was amplified by 3' race method. The gene specific primer, 5' ATGTATGACGTCATTATTAT 3' and oligo-dT primers were used for PCR reaction following cDNA Amplification Kits for Rapid Amplification of cDNA Ends - 5' RACE & 3' RACE (Clontech, Takara Bio Company) manuscript.

### ***2.5 Culture and preparation of bacteria cell for gene expression analysis***

To determine the expression level of the thioredoxin reductase (*TrxR*) gene from *B. licheniformis*, the bacterial cells were grown in LB medium at 37°C for 24 h in an incubator shaker. These cells were then tested using a dual culture procedure (Mahadtanapuk, 2007). The bacterial cells extracted from different incubation times with the fungi were then used for RNA extraction to test for the gene expression analysis.

### ***2.6 Gene expression by RT-PCR analysis***

Total RNA from *B. licheniformis* at different incubation times (5, 7 and 10 days) with fungi was extracted according to the standard from the RNeasy® Mini Handbook (QIAGEN). The RNA was used as the template for a reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), where specific forward and reverse primers were designed from the *B. licheniformis* (*trx* gene) sequences, Trx-F (5' ATGTATGACGTCATTATTAT 3') and Trx-R (5'

TGCCGATGTAGATAAAGACG 3'). The PCR mixture contained 20 ng of the cDNA, 200  $\mu$ M dNTPs, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl, 0.25  $\mu$ M of each primer and 2 units of Taq polymerase buffer in a 20- $\mu$ l total volume. Amplification was carried out with a thermal cycler (Perkin Elmer, Gene Amp PCR 2400) for 30 cycles at 94°C for 1 minute, 60°C for 1 minute and 72°C for 1 minute. A final elongation step was carried out at 72°C for 5 minutes. The PCR products were separated by electrophoresis on 1% agarose gels.

The entire experimental and investigational flow diagram is depicted in Fig. 4.

### 3. Results and Discussion

#### ***3.1 Ion beam bombardment effects on survival and mutation***

To determine the ion beam fluence which could best induce mutation, the median lethal dose (LD50) was determined as shown in Fig. 5. As expected, the survival of the ion-beam-bombarded bacteria decreased with increasing of the ion fluence. In addition, the vacuum also slightly reduced cell survival as demonstrated by the survival curve of the vacuum control cells which were un-bombarded but exposed to vacuum only. Since the ion beam fluence was linearly proportional to the bombarding time, higher fluence corresponded to longer vacuum exposure times for the cells. The slight decreases in the vacuum control cell survival indicated that the vacuum had very limited effect on the cell survival, and thus in the study of the ion bombardment effect, the vacuum effect could be neglected. As can be seen in Fig. 5, the cell survival rates of the un-bombarded cells and the bombarded cells are not significantly different at fluence levels of  $10^{14}$  and  $10^{15}$  ions/cm<sup>2</sup>, whereas they significantly differ at the fluence of  $10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>, which gives rise to the lowest survival rate. This fact

indicates that ion bombardment at the highest ion fluence induced the most damage to the bacterial cell and the cell inner components as well, considerably more than the damage caused by the vacuum alone. Therefore, the ion fluence of  $10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup> was used in the experiment to induce mutations in *B. licheniformis*.

Many studies have reported that low-energy ion beams can induce mutations in bacteria (Xie, 2004; Yu, 2006; Zhang, 2008; Mahadtanapuk, 2009). The physical mechanisms for these mutations are thought to include both direct and indirect interactions between the energetic ions and DNA. In the case of bacteria, the direct interaction is thought to be dominant. *B. licheniformis* is a gram positive bacterium with a size on the order of a few micrometers and has a cell wall of about 25 nm in thickness surrounding its plasma membrane (Voet and Voet, 1990), which is fairly thin (only a few nanometers). The projectile range of 30-keV N ions in the cell wall material is calculated to be 134 nm with a sputtering yield of 0.363 (PROFILE, 2003). Using the cell wall model (Yu, 2003) yields a final ion penetration depth of about 400 nm through the cell wall for a fluence of  $10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>. Since this ion penetration depth is greater than the total thickness of the bacterial cell envelope, the N ions not only pierce the bacterial cell envelope but can also penetrate into the cytoplasm to interact directly with DNA. Although such ions most likely have reduced energies due to cell penetration, reports have already demonstrated that ions with the energy as low as keV and even lower are still able to induce DNA conformation change (Chen, 1998; Lacombe, 2004; Deng, 2005; Hunniford, 2007) and subsequently potential mutation of bacteria (Norarat, 2009; Sarapirom, 2010). Therefore, bacterial mutation induction by the 30-keV N-ion beam is completely possible.

To identify mutants, the ion-bombarded bacteria were screened and selected for antagonistic activity. To study the gene(s) and the functions involved in their antagonistic ability, a dual culture test was performed using more than 100 colonies selected at random

from both ion-bombarded and un-bombarded bacteria (control), respectively. The un-bombarded bacteria and most of the bombarded bacteria showed the same inhibition ability to the disease caused by *C. musae*, but one isolate of the bombarded bacteria was found to have lost the antifungal activity, as shown in Fig. 2B. That bacterial isolate was subsequently used to test for the mutation induced by the ion beam irradiation. The HAT-RAPD fingerprint analysis showed a different fingerprint when using primer by sequence 5' TGCCGATGTA 3' show polymorphism band with an absence of DNA bands between the bacterial isolate and the wild type, but the same fingerprints for other primers between the isolate and the wild type, showing a single change in the mutant DNA (Fig 6).

### **3.2 Gene identification**

After the mutant was found, the polymorphic fragment from the HAT-RAPD fingerprint, which was the only one missing in the mutant, was subcloned into a pTZ57R/T plasmid and subsequently sequenced. The resulting nucleotide sequence, which contained 711 bp. (237 amino acids), was blasted against the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. It was found that the gene was significantly related to the thioredoxin reductase (*TrxR*) gene. Using this gene target, the full length of the *TrxR* gene was amplified by PCR using specific primer. After full gene analysis with 3' race method, the cDNA fragment content with 942 bp. (314 amino acid). When the nucleotide sequence from this analysis was blasted against the NCBI database, it was found to be highly homologous to the *TrxR* gene from multiple bacterial strains, including *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* str. W23 and *Exiguobacterium sibiricum* 255-15 with 97%, 81% and 72% identities, respectively, as shown in Table 1. Moreover, when the nucleotide sequence was translated to amino acids, it was also found to be highly

homologous to the thioredoxin reductase amino acids from multiple *Bacillus* strains, including *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus pumilus* SAFR032 (Fig. 7). The function of the *TrxR* gene is in the defense against stress and the thioredoxin system of bacteria, yeasts and mammals is involved in regulating DNA synthesis, gene transcription, enzyme synthesis, cell growth and apoptosis (Holmgren, 1985). Thioredoxin reductase, a flavoenzyme homodimer, binds flavin adenine dinucleotide and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), reduces the oxidoreductase thioredoxin and is found in two forms throughout all five kingdoms. The high-molecular-weight isoform which most likely evolves from glutathione reductase rather than the prokaryotic thioredoxin reductase (Prinz, 1997) is present in mammals and some parasites, while the low-molecular-weight isoform is found in most bacteria, plants, and fungi (Windle, 2000). Both isoforms are thought to have independently evolved to have similar substrate specificity profiles. Although both isoforms have similar functions, they have very distinct protein structures.

### **3.3 Gene expression for antagonism to fungal infection**

To investigate the gene expression, an assay for antagonism of *B. licheniformis* against the fungus was performed on PDA medium by a dual culture method (Mahadtanapuk, 2007), as shown in Fig. 8. It can be seen in the figure that the fungal growth is clearly inhibited particularly for 10 days of culture. The *B. licheniformis* sample showed fungal inhibition percentages of 71%, 80% and 92% at 5, 7 and 10 days, respectively, as shown in Fig. 8A. The result was related to the expression of the *TrxR* gene activity. Fig. 8B shows the result of the RT-PCR analysis of the gene in terms of the level of the gene expression or the transcription of *TrxR*. The thickness of the DNA band, or the amount of cDNA, indicates the

gene expression level. As seen from the figure, both the fungal inhibition percentages and the DNA band thickness in the RT-PCR analysis increase with the co-cultivating days, whereas when the bacteria were not co-cultivated with fungi there was small DNA band and thus low expression of the *TrxR* gene. Fig. 9 gives a quantitative illustration of the co-cultivating time evolution of both the inhibition percentages and the *TrxR* gene expression. The almost synchronous time evolution of the fungal inhibition due to the bacteria *B. licheniformis* and the *TrxR* gene expression demonstrates the *TrxR* gene indeed responsible for the fungal inhibition. As for the uniqueness of the gene involved and mechanisms of how this gene is related to protein, enzyme or antagonistic activity, further studies are being carried out.

#### **4. Conclusion**

In order to locate and identify the gene involved in the antagonistic mechanism of *B. licheniformis* against fungal disease, we adopted a novel method. Low-energy ion beam was applied to induce bacterial mutants which lost the antagonistic property, and then the polymorphism band that was missing in the fingerprint of the bacterial mutant but present in the wild-type bacteria was found, subcloned and sequenced. Our analysis revealed that the gene which was missing in the mutant and should thus be responsible for the antagonistic property was related to the thioredoxin reductase (*TrxR*) gene. This gene was demonstrated to have the highest expression when the bacteria were co-cultivated with disease fungi for 10 days, indicating the gene indeed being as the contributor for the bacteria *B. licheniformis* to be antagonistic to disease fungi.

## **Acknowledgements**

The work was supported by the Central of Laboratory, University of Phayao Research Fund, the Thailand Research Fund (TRF) (Project MRG5380221), the National Research Council of Thailand (NRCT), the Thailand Center of Excellence in Physics (ThEP), and the International Atomic Energy Agency (IAEA).

## **References**

Agrios, G.N., 2005, Plant Pathology, 5<sup>th</sup> Edition, Elsevier Academic Press, New York, p. 398.

Anuntalabchais, S., Chandej, R., Chiangda, J., Apavatjrut, P., 2000. Genetic diversity within lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) based on RAPD analysis. *Acta Horticulture* 575, 253-259.

Chen, Y., Jiang, B.Y., Chen, Y.S., Ding, X.Z., Liu, X.H., Chen, C.S., Guo, X.Y., Yin, G.L., 1998. Formation of plasmid DNA strand breaks induced by low-energy ion beam: indication of nuclear stopping effects. *Radiat. Environ. Biophys.* 37, 101-106.

Deng, Z.W., Bald, I., Illenberger, E. and Huels, M.A., 2005. Beyond the Bragg peak: hyperthermal heavy ion damage to DNA components. *Phys. Rev. Lett.* 95, 153201-153204.

Feng, H.Y., Yu, Z.L., Chu, P.K., 2007. Ion implantation of organisms. *Mater. Sci. Eng. R* 54, 49-120.

Holmgren, A., 1985. Thioredoxin. Annu. Rev. Biochem. 54, 237-271.

Hunniford, C.A., Timson, D.J., Davies, R.J.H. and McCullough, R.W., 2007. Damage to plasmid DNA induced by low energy carbon ions. Phys. Med. Biol. 52, 3729-3740.

Jeffries, P. and Korsten, L, 2000. Potential for biocontrol of *Colletotrichum*, in: Prusky, D., Freeman, S. and Dickman, M.B. (Eds.), *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host-pathogen Interactions*, Amer Phytopathological Society Press, pp. 266-291.

Lacomb, S., Le Sech, C. and Esaulov, V.A., 2004. DNA strand breaks induced by low keV energy heavy ions. Phys. Med. Biol. 49, N65-N73.

Mahadtanapuk, S., Sanguansermsri, M., Cutler, R.W., Sardsud, V., Anuntalabchchai, S., 2007. Control of anthracnose caused by *Colletotrichum musae* on *Curcuma alismatifolia* Gagnep. Using antagonistic *Bacillus* spp.. Am. J. Agric. Biol. Sci. 2(2), 54-61.

Mahadtanapuk, S., Sanguansermsri, M., Yu, L.D., Vilaithong, T., Anuntalabchchai, S., 2009. Cloning of antifungal gene from *Bacillus Licheniformis* induced by low-energy ion beam bombardment, Surf. Coat. Technol. 203, 2546-2549.

McLaughlin, R.J., Wilson, C.L., Droby, S., Ben-Arie, R., Chalutz, E., 1992. Biological Control of Postharvest Diseases of Grape, Peach, and Apple with the Yeasts *Kloeckera apiculata* and *Candida guilliermondii*. Plant Disease 76, 470-473.

Mills, P.R., Hodson, A., Brown, A.E., 1992. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruits, in: Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (Eds.), *Colletotrichum – Biology, Pathology and Control*, CAB International Mycological Institute: UK, pp. 269-288.

Norarat, R., Semsang, N., Anuntalabchchai, S. and Yu, L.D., 2009. Low-energy low-fluence ion beam bombardment of naked plasmid DNA. Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B 267, 1650-1653.

O'Brien, R.D., Lindow, S.E., 1989. Effect of plant species and environmental conditions on epiphytic population sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria. *Phytopathol.* 79, 619-627.

PATRIC, 2009. Phylogenetic Tree of *Bacillus*, Pathosystems Resources Integration Center (PATRIC), National Institutes of Health (NIH), Blacksburg, VA 24061, under Contract No. HHSN272200900040C,

<http://www.patricbrc.org/portal/portal/patric/Phylogeny?cType=taxon&cId=1386>.

Phanchaisri, B., Chandet, R., Yu, L.D., Vilaithong, T., Jamjod, S., Anuntalabchchai, S., 2007. Low-energy ion beam-induced mutation in Thai jasmine rice (*Oryza sativa* L. cv. KDM105), *Surf. Coat. Technol.* 201, 8024-8028.

Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A., Beckwith, J., 1997. The role of the Thioredoxin and Glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 272, 15661-15667.

PROFILE code, Version 3.60, 2003. Implant Sciences Corp., Wakefield, MA01880, USA.

Royse, D.J. and Ries, S.M., 1977. The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cinata*. *Phytopathol.* 63, 603-607.

Sarapirom, S., Sangwijit, K., Anuntalabchchai, S., Yu, L.D., 2010. Plasma immersion low-energy-ion implantation effect on naked DNA. *Surf. Coat. Technol.* 204, 2960-2965.

Siala, A. and Gray, T.R.G., 1974. Growth of *Bacillus subtilis* and spore germination in soil observed by a fluorescent-antibody technique. *J. General Microbiology* 81, 191-198.

Sickmore, A.M. and Dickinson, C.H., 1976. Colony interaction and hyphal interference between *Septoria nodorum* and phylloplane fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 66 57-64.

Van Loon, L.C., 2000. Biotechnological approaches in biocontrol of plant pathogens, Mukerji, K.G., Chamola, B.P., Upadhyay, R.K. (Eds.), Kluwer/Plenum, New York, 1999, pp. 255. *Phytochemistry* 54, 445-446.

Voet, D. and Voet, J.G., 1990. *Biochemistry*, John Wiley & Sons, New York, p.262.

Ward, J.F., 1971. Deoxynucleotides — models for studying mechanisms of strand breakage in DNA — I protection by sulphhydryl compounds. *Int. J. Radiat. Phy. Chem.* 3, 239-249.

Windle, H.J., Fox, A., NiEidhin, D., Kelleher, D., 2000. The thioredoxin system of *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 275, 5081- 5089.

Xie, C.X., Xu, A., Wu, L.J., Yao, J.M., Yang, J.B., Yu, Z.L., 2004. Comparison of base substitutions in response to nitrogen ion implantation and 60Co-gamma ray irradiation in *Escherichia coli*, *Genetics and Molecular Biology* 27, 284-290.

Yamaguchi, H., Nagatomi, S., Morishita, T., Degi, K., Tanaka, A., Shikazono, N., Hase, Y., 2003. Mutation induced with ion beam irradiation in rose. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* 206, 561-564.

Yu, L.D. and Anuntalabchchai, S., 2010. Low-energy ion beam biology research at Chiang Mai University, *Surf. Coat. Technol.*, in press.

Yu, L.D., Sangyuenyongpipat, S., Seprom, C., Thongleurm, C., Suwanksum, R., Tondee, N., Prakrajang, K., Vilaithong, T., Brown, I.G., and Wiedemann, H., 2007. A specialized bioengineering ion beam line. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* 257, 790-795.

Yu, L.D., Vilaithong, T., Brown, I., 2006 (English Edition Eds), *Introduction to Ion Beam Biotechnology*, originally authored by Yu Zengliang in Chinese, Springer Science & Business Media, New York.

Yu, L.D., Vilaithong, T., Phanchaisri, B., Apavatjrut, P., Anuntalabchchai, S., Evans, P. and Brown, I.G., 2003. Ion penetration depth in the plant cell wall, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* 206, 586-590.

Yu, Z.L., Deng, J.G., He, J.J., Huo, Y.P., Wu, Y.J., Wang, X.D., Liu, G.F., 1991. Mutation breeding by ion implantation. Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B 59/60, 705-708.

Yu, Z.L., 2007. Study on the interaction of low-energy ions with organisms. Surf. Coat. Technol. 201, 8006-8013.

Zhang, X.S., Li, Y.G., Wu, Y.J., Zhou, J.C., Chen, D.S. and Lei, L., 2008. Mutation Breeding of an Organic Phosphorus-Solubilizing Bacterium B3 by Low Energy Ion Beam Implantation. Plasma Sci. Technol. 10, 645-648

**Table 1.** The nucleotide sequence of the *TrxR* gene from *Bacillus licheniformis* (A), and the result of the sequence comparison with the NCBI database (B).

(A)

**atgtat**tgacgtcattattatcgagcaggcctgcgggaatgacggcagccgttatacg  
M Y D V I I I G A G P A G M T A A V Y T  
tcaaggcgaacctgtcgactttatgggttggaaagaggcgttccggggacagatggcc  
S R A N L S T L M V E R G V P G G Q M A  
aatacggaggatgtcgaaaactatccgggatttggaaagcattctgggaccagagcttca  
N T E D V E N Y P G F E S I L G P E L S  
aataaaaatgtttaacatgcgaaaaagttcgccgctgatgcctatggcgatattaaa  
N K M F E H A K K F G A E Y A Y G D I K  
gaagtgcgtcgatggaggagactacaagatcgtcaaagcgggatcaaaaagaattaaagcg  
E V V D G G D Y K I V K A G S K E F K A  
cgtgcggtcatcatcacagcaggccgaatataagaagctcgccgtacctggcgaaaaaa  
R A V I I T A G A E Y K K L G V P G E K  
gagcttggccggccgggttatcttattgtcggttgcacggcattttaaaaac  
E L G G R G V S Y C A V C D G A P F K N  
aaagagctcgctgttgcggaggaggactccgctgttgaagaaggcgttacttaacc  
K E L V V V G G D S A V E E G V Y L T  
cgtttgcgttgcggactacgatgtccacccggcgcataagctgagagcgcggatc  
R F A S K V T I V H R R D K L R A Q S I  
ctacaggccgcgcgcgttgcacaacgaaaaagtcgactttctggaaacaagacggcgtcaag  
L Q A R A F D N E K V D F L W N K T V K  
gaaattcatgaaaaagacggaaaggctggtaaagtaacgcgtggcatacggtcacaggc  
E I H E K D G K V G K V T L V D T V T G  
gaagaagaagagttccggactgacggcgttcatacatccggcatgcgttca  
E E E E F R T D G V F I Y I G M L P L S  
gagccgttcaaaaacctcggcattacaaatgaagaggcgtacatcgtgacaaaatgaacag  
E P F K N L G I T N E E G Y I V T N E Q  
atggaaaacaaaagtcgaaggcattttgcgggagacattcgcgagaaaacccttcgc  
M E T K V E G I F A A G D I R E K T L R  
caaatcgtaacggcaacaggggacggaaagcattgccgcacagagcgttgcactatatc  
Q I V T A T G D G S I A A Q S V Q H Y I  
gaagagctgaaaagagaaaaggctgtaaaataa  
E E L K E K A V K -

**Red letter is show primer sites in HAT-RAPD and underline is show primer site in RT-PCR**

(B)

<i>Bacterial species</i>	<i>Identity (%)</i>
<i>Bacillus licheniformis</i> (this paper)	100
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	97
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. spizizenii str. W23	81
<i>Exiguobacterium sibiricum</i> 255-15	72

## Figure Captions

**Fig. 1.** Anthracnose of curcuma: (A) conidia and (B) acervulus of *C. musae*, (C) diseased flower and (D) diseased flower controlled by *B. licheniformis*. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 2.** A dual culture test of the bacterial antagonistic activity. (A) Wild type of *B. licheniformis*. (B) Mutant of *B. licheniformis*. In each dish, on the left side are the bacteria while on the right are the fungi *C. musae*. In (A), the fungal radial growth was inhibited by the bacteria, showing the antagonism of the bacteria, but in (B) the fungal radial growth was expanded, showing the lost antagonism. (B) can be actually taken as control for a comparison with the bacterial antagonism shown in (A). In eq. (1),  $R1$  is the fungal radial growth distance shown in (B) while  $R2$  is that shown in (A).

**Fig. 3.** Photograph of the bioengineering ion beam facility at Chiang Mai University.

**Fig. 4.** Experimental flow and logic diagram.

**Fig. 5.** The result of the median lethal dose (LD50) test.

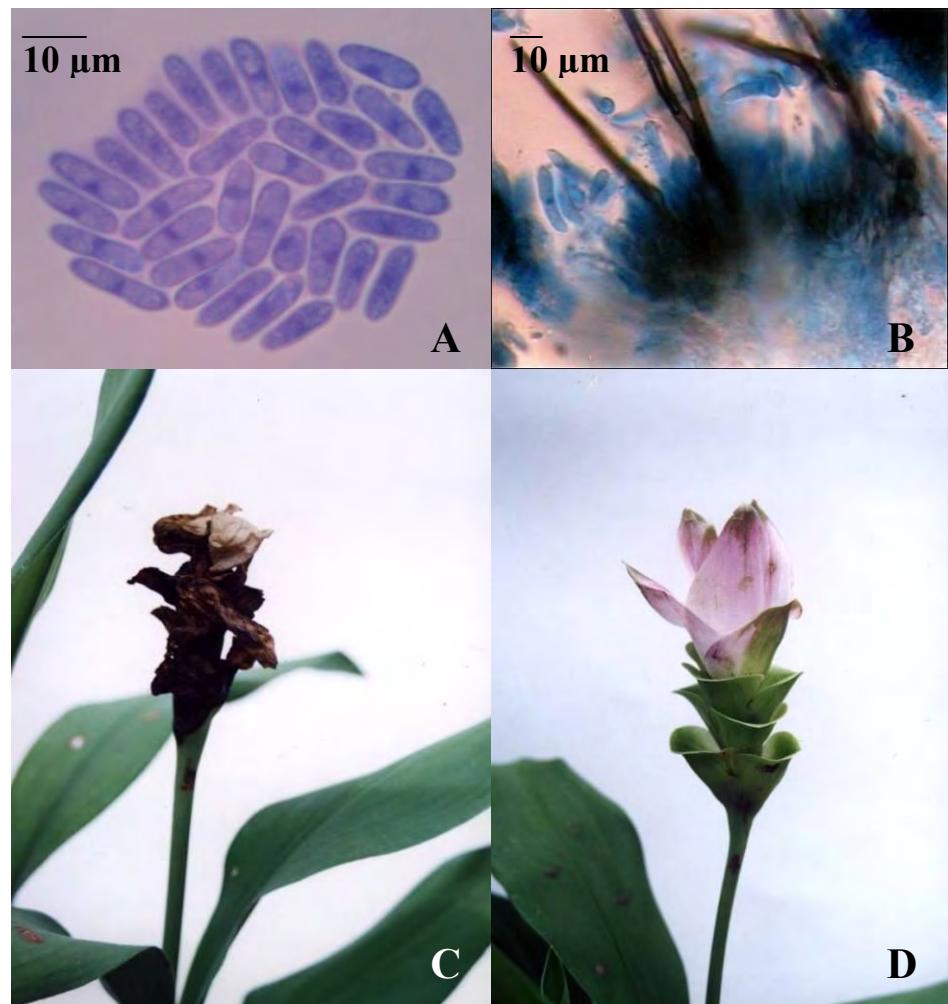
**Fig. 6.** HAT-RAPD amplification products of the bacteria. A: bacterial mutant. B: irradiated but normal bacteria. C: control. The arrow indicates the band of polymorphism, which was missing in A and was later subcloned into pTZ57R/T plasmid.

**Fig. 7.** Comparison in *TrxR* gene from *B. licheniformis* with that from other *Bacillus* bacteria.

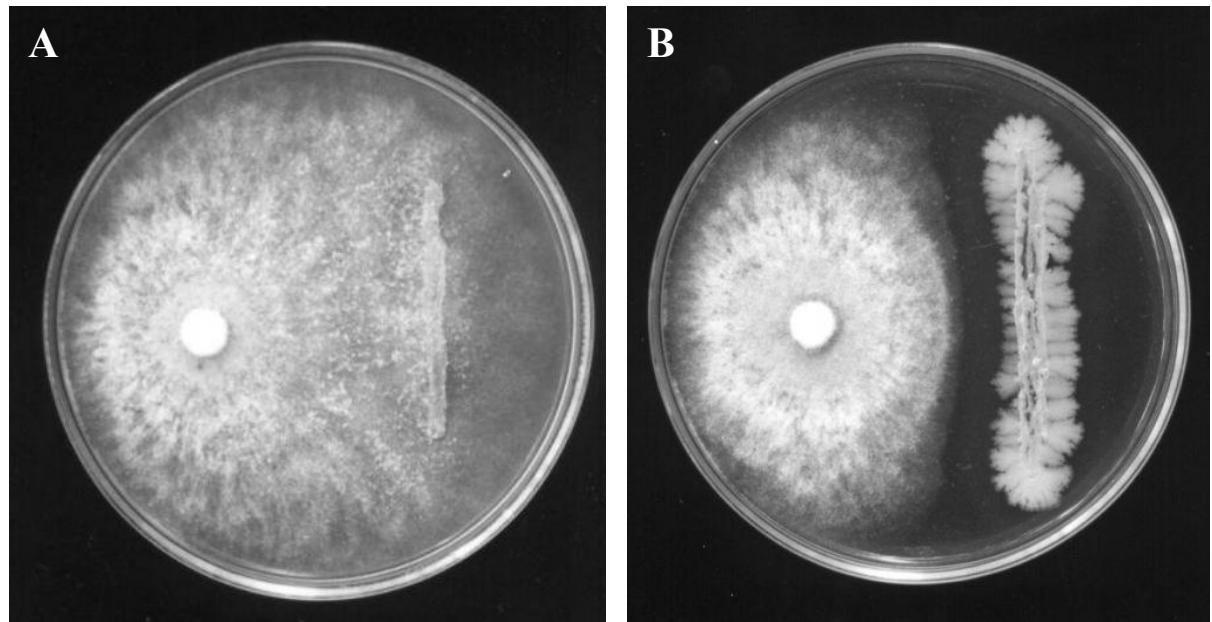
(A) The multiple sequence alignment of amino acid part of the *TrxR* peptide from 11 species of *Bacillus* spp. including the *B. licheniformis* used in this study. (B) The phylogenetic tree of the 11 *Bacillus* species analyzed in (A), showing the identity of the amino acid of the *B. licheniformis* used in this study to those of the other species. This part of the phylogenetic tree was constructed based on the entire phylogenetic tree of *Bacillus* (PATRIC, 2009).

**Fig. 8.** The gene expression analysis of gene *TrxR* in *B. licheniformis* bacterial cells at different co-cultivation times with the fungus. (I) Bacteria (at the left side of each dish) were co-cultivated with the fungus (at the right side of each dish) at varying times. (II) RT-PCR analysis: The bacteria were co-cultivated with the fungus for 5, 7 and 10 days, respectively and the bacteria were not co-cultivated with the fungi for the same time. The total RNA is a control to indicate the gene expression having no errors from the initial total RNA.

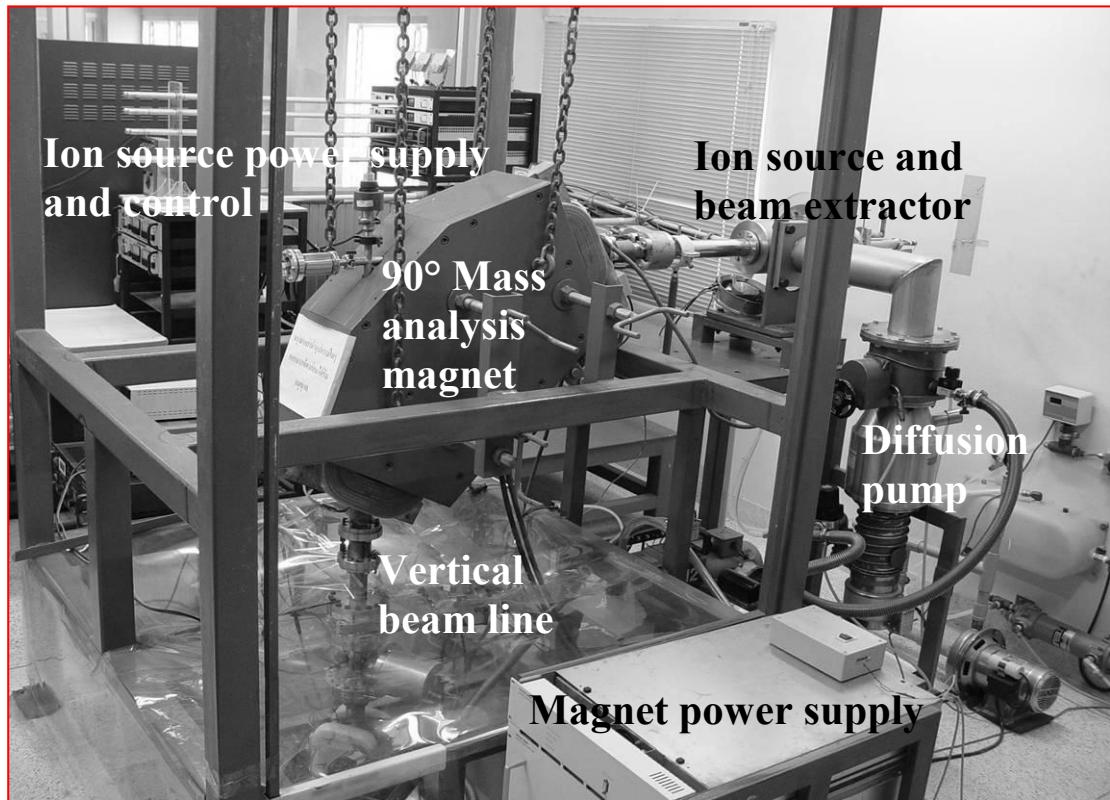
**Figure 9.** Quantitative analysis of the fungus inhibition and the *TrxR* gene expression. The fungus inhibition percentages are calculated according to the text in Results and Discussion. The gene expression percentages are calculated based on the relative thickness (or intensity) of the *TrxR* fragment band obtained from the RT-PCR analysis (see Fig. 8B) such that the band thickness at the 10<sup>th</sup> co-cultivating day is used as 100% and other bands are relative to it. The data show an almost synchronous time evolution of both fungus inhibition and *TrxR* gene expression.



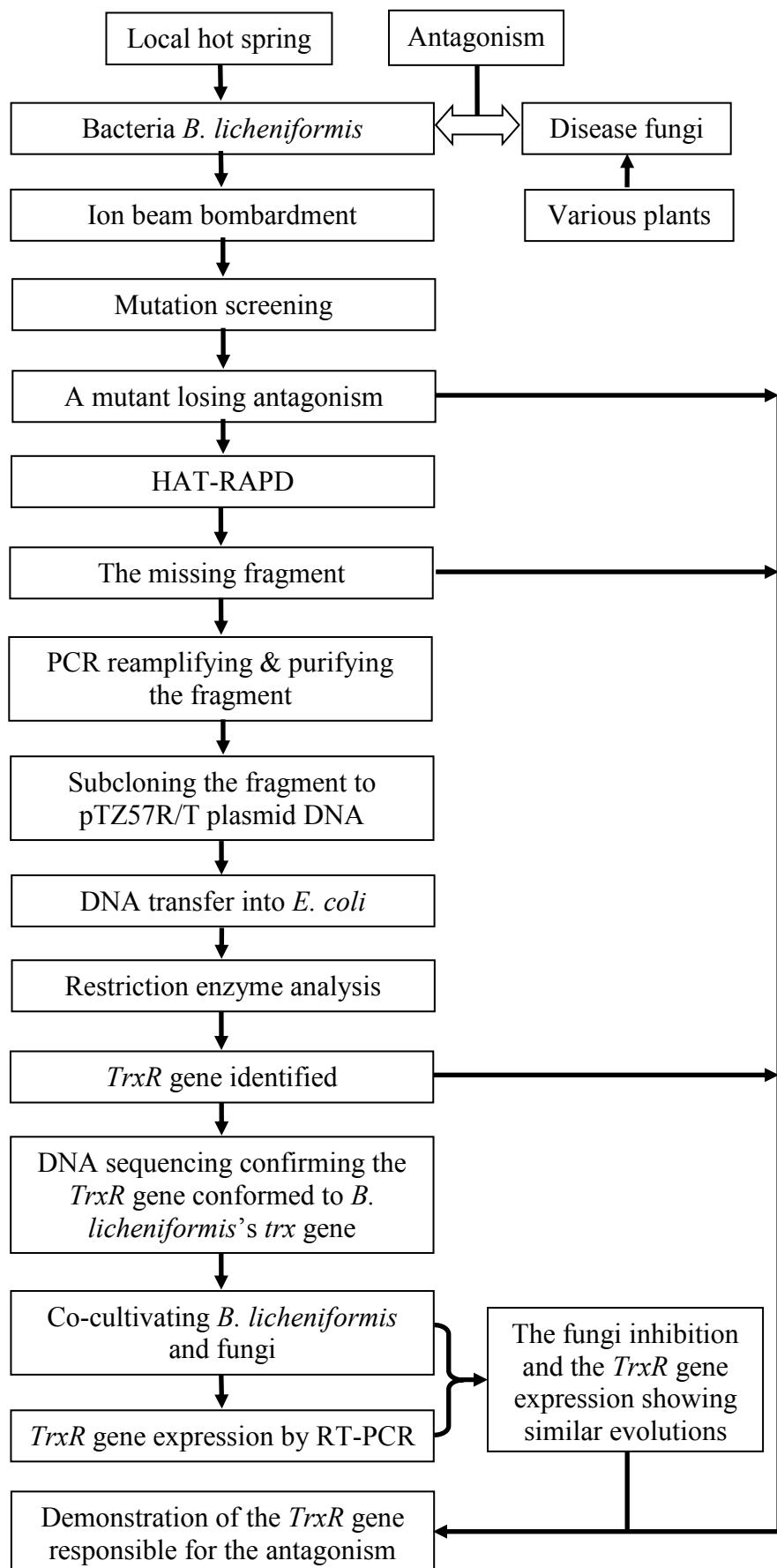
**Figure 1**



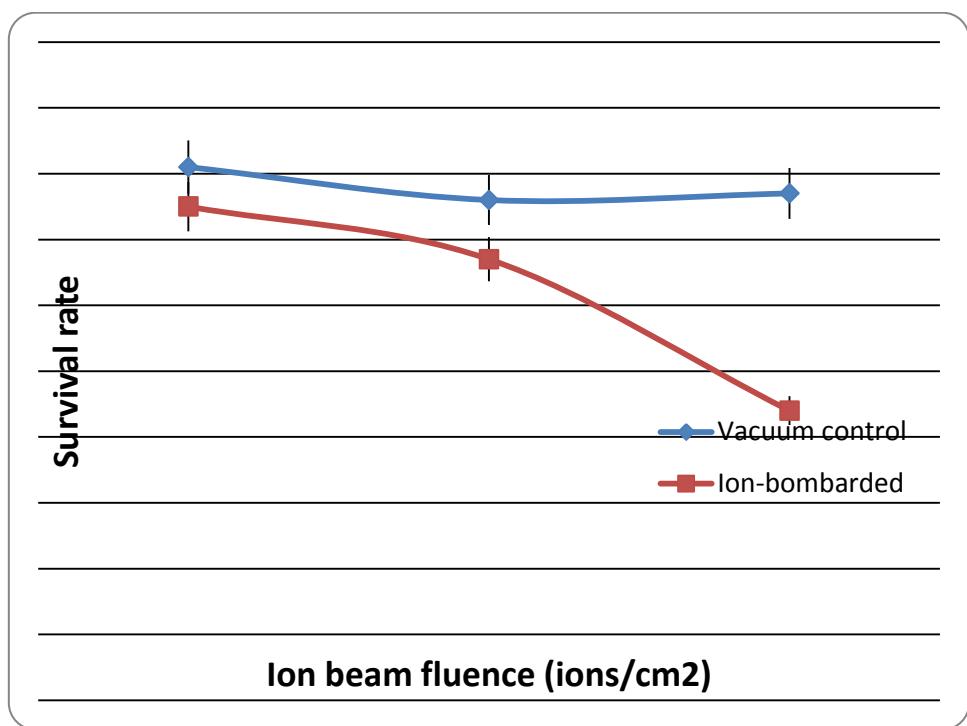
**Figure 2**



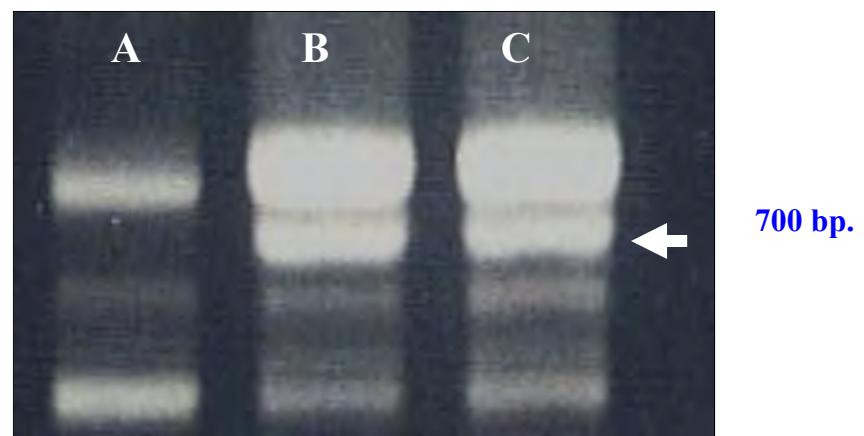
**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**

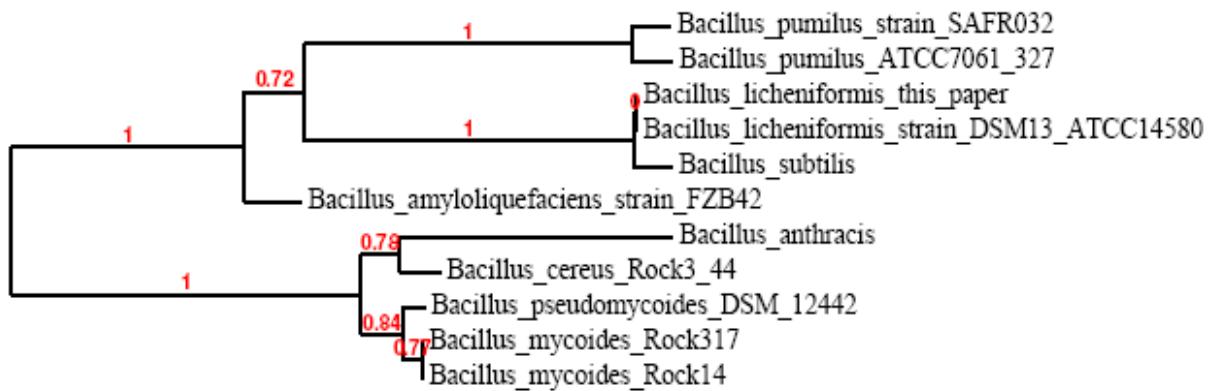


**Figure 6**

CLUSTAL FORMAT: MUSCLE (3.7) multiple sequence alignment

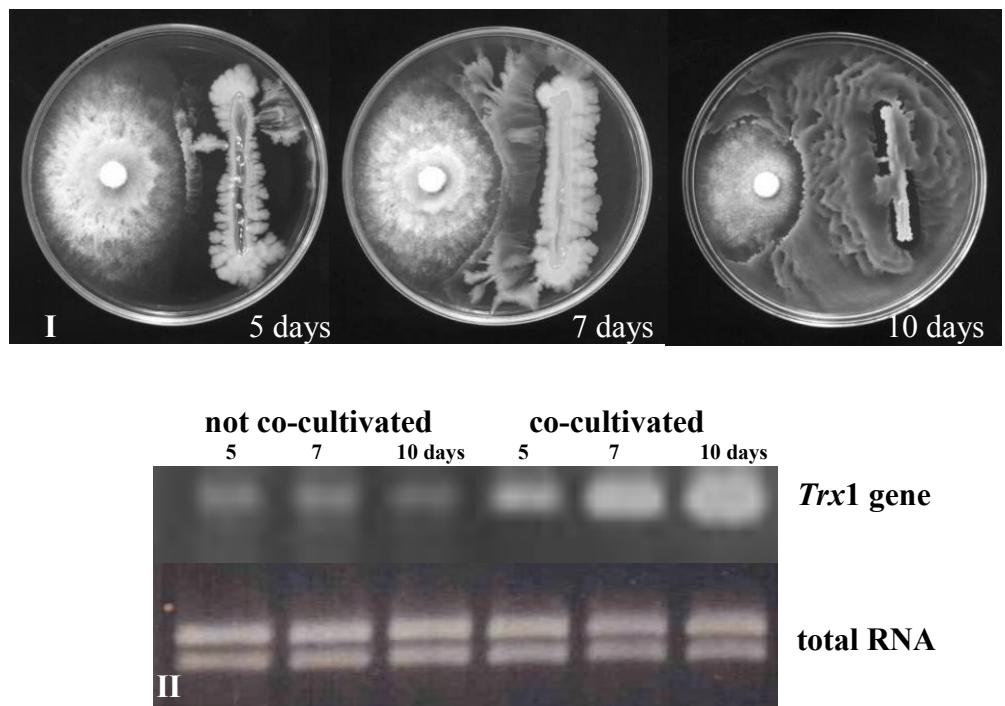
B.anthraci	IYDVIIIGAGPAGMTAAVYTSRANLSTLMLERGIPGGQMANTEDVENYPGYESILGPDLS
B.c.Rock3	IYDVIIIGAGPAGMTAAVYTSRANLSTLMLERGIPGGQMANTEDVENYPGYESILGPDLS
B.m.Rock31	IYDVIIIGAGPAGMTAAVYTSRANLSTLMLERGIPGGQMANTEDVENYPGYESILGPDLS
B.m.Rock14	IYDVIIIGAGPAGMTAAVYTSRANLSTLMLERGIPGGQMANTEDVENYPGYESILGPDLS
B.ps.DSM_1	IYDVIIIGAGPAGMTAAVYTSRANLSTLMLERGIPGGQMANTEDVENYPGYESILGPDLS
B.pu.strai	IYDTIIIGAGPAGMTAAVYTSRGNLSTLMIERGIPGGQMANTEDVENYPGFESILGPELS
B.pu.ATCC7	IYDTIIIGAGPAGMTAAVYTSRGNLSTLMIERGIPGGQMANTEDVENYPGFESILGPELS
B.a.strain	IYDVIIIGAGPAGMTAAVYTSRANLSTLMIERGIPGGQMANTEDVENYPGFESILGPELS
B.l.this_p	MYDVIIIGAGPAGMTAAVYTSRANLSTLMVERGVPGGQMANTEDVENYPGFESILGPELS
B.l.strain	MYDVIIIGAGPAGMTAAVYTSRANLSTLMVERGVPGGQMANTEDVENYPGFESILGPELS
B.subtilis	MYDVIIIGAGPAGMTAAVYTSRANLSTLMVERGVPGGQMANTEDVENYPGFESILGPELS
	:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***
B.anthraci	NKMFHAKKFGAEAYGDVKEIDGKEYKTI IAGKKEYKARAIIVASGAEYKKIGVPGET
B.c.Rock3	NKMFHAKKFGAEAYGDVKEIDGKEYKTI IAGKKEYKTRAIIVASGAEYKKIGVPGEK
B.m.Rock31	NKMFHAKKFGAEAYGDVKEIDGKEYKTTVAGKKEYKTRAIIVASGAEYKKIGVPGEK
B.m.Rock14	NKMFHAKKFGAEAYGDVKEIDGKEYKTTVAGKKEYKTRAIIVASGAEYKKIGVPGEK
B.ps.DSM_1	NKMFHAKKFGAEAYGDVKEIDGKEYKTTVAGKKEYKTRAIIVASGAEYKKIGVPGEK
B.pu.strai	NKMFHAKKFGAEAYGDIKEIIVDGEYKIVKAGSKEYKGRSVIISAGAEYKKIGAPGEK
B.pu.ATCC7	NKMFHAKKFGAEAYGDIKEIIVDGEYKIVKAGSKEYKGRSVIIAAGAEYKKIGAPGEK
B.a.strain	NKMFHAKKFGAEAYGDIKEIIVDGEYKIVKAGSKEYKARAVIIAAGAEYKKIGVPGEK
B.l.this_p	NKMFHAKKFGAEAYGDIKEVVDGGDYKIVKAGSKEFKARAVIITAGAEYKKLGVPGEK
B.l.strain	NKMFHAKKFGAEAYGDIKEVVDGGDYKIVKAGSKEFKARAVIITAGAEYKKLGVPGEK
B.subtilis	NKMFHAKKFGAEAYGDIKEVVDGGDYKIVKAGSKEFKARAVIITAGAEYKKLGVPGEK
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
B.anthraci	ELGGRGVSYCAVCDGAFFKGKELVVIIGGGDSAVEEGVFLTRFASKVTIVHRRDTLRAQKI
B.c.Rock3	ELGGRGVSYCAVCDGAFFKGKELVVIIGGGDSAVEEGVYLTRFASKVTIVHRRDALRAQKI
B.m.Rock31	ELGGRGVSYCAVCDGAFFKGKELVVIIGGGDSAVEEGVYLTRFASKVTIVHRRDALRAQKI
B.m.Rock14	ELGGRGVSYCAVCDGAFFKGKELVVIIGGGDSAVEEGVYLTRFASKVTIVHRRDALRAQKI
B.ps.DSM_1	ELGGRGVSYCAVCDGAFFKGKELVVIIGGGDSAVEEGVYLTRFASKVTIVHRRDALRAQKI
B.pu.strai	ELGGRGVSYCAVCDGAFFKNEKELVVIIGGGDSAVEEGVYLTRFASKVTIVHRRDKLRAQSI
B.pu.ATCC7	ELGGRGVSYCAVCDGAFFKNEKELVVIIGGGDSAVEEGVYLTRFASKVTIVHRRDKLRAQSI
B.a.strain	ELGGRGVSYCAVCDGAFFKNEKELVVIIGGGDSAVEEGVYLTRFASKVTIVHRRDKLRAQSI
B.l.this_p	ELGGRGVSYCAVCDGAFFKNEKELVVIIGGGDSAVEEGVYLTRFASKVTIVHRRDKLRAQSI
B.l.strain	ELGGRGVSYCAVCDGAFFKNEKELVVIIGGGDSAVEEGVYLTRFASKVTIVHRRDKLRAQSI
B.subtilis	ELGGRGVSYCAVCDGAFFKNEKELVVIIGGGDSAVEEGVYLTRFASKVTIVHRRDKLRAQSI
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
B.anthraci	LQDRAFQNEKVDIWNHTIKEINEANGKVGSVTLVDVNSGEEKEVKTGKFVYIGMLPLS
B.c.Rock3	LQDRAFQNEKVDIWNHTVKIEINEENGKVGSVTLVDVNSGEEQEFKTDGVFIYVGMLPLS
B.m.Rock31	LQDRAFQNEKVDIWNHTVKIEINEENGKVGSVTLVDVNTGEEQEFEKADGAFIYIGMLPLS
B.m.Rock14	LQDRAFQNEKVDIWNHTVKIEINEENGKVGSVTLVDVNTGEEQEFEKADGAFIYIGMLPLS
B.ps.DSM_1	LQDRAFQNEKVDIWNHTVKIEINEENGKVGSVTLVDVNTGEEQEFEKADGAFIYIGMLPLS
B.pu.strai	LQARAFDNEKIDFMWNKTVQINEENGKVGSVTLIDTVTGEKEDFTDGVFIYIGMLPLS
B.pu.ATCC7	LQARAFDNEKIDFMWNKTVQINEENGKVGSVTLIDTVTGEEDFTDGVFIYIGMLPLS
B.a.strain	LQARAFDNEKVDLWNKTVKIEHEENGKVGTVLVDVTGEESEFKTDGVFIYIGMLPLS
B.l.this_p	LQARAFDNEKVDLWNKTVKIEHEKDGVGVKVTLVDVTGEEEEEFRTDGVFIYIGMLPLS
B.l.strain	LQARAFDNEKVDLWNKTVKIEHEKDGVGVKVTLVDVTGEEEEEFRTDGVFIYIGMLPLS
B.subtilis	LQARAFDNEKVDLWNKTVKIEHEQDGKVGKVTLVDVTGEEEEEFRTDGVFIYIGMLPLS
	***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
B.anthraci	KPFVELGITNENGYLETNERMETKVP
B.c.Rock3	KPFTELGITNENGYIETNERMETKVP
B.m.Rock31	KPFTELGITNENGYIETNERMETKVP
B.m.Rock14	KPFTELGITNENGYIETNERMETKVP
B.ps.DSM_1	KPFIELGITNENGYIETNERMETKVP
B.pu.strai	KPFENLGITNEEGYIETNER-----
B.pu.ATCC7	KPFENLGITNEEGYIETNER-----
B.a.strain	KPFENLGITNEEGYIETNDR-----
B.l.this_p	EPFKNLGITNEEGYIVTNEQ-----
B.l.strain	EPFKNLGITNEEGYIVTNEQ-----
B.subtilis	EPFKNLGITNEEGYIVTNEQ-----
	:***:*****:*****:*****:*****

(A)

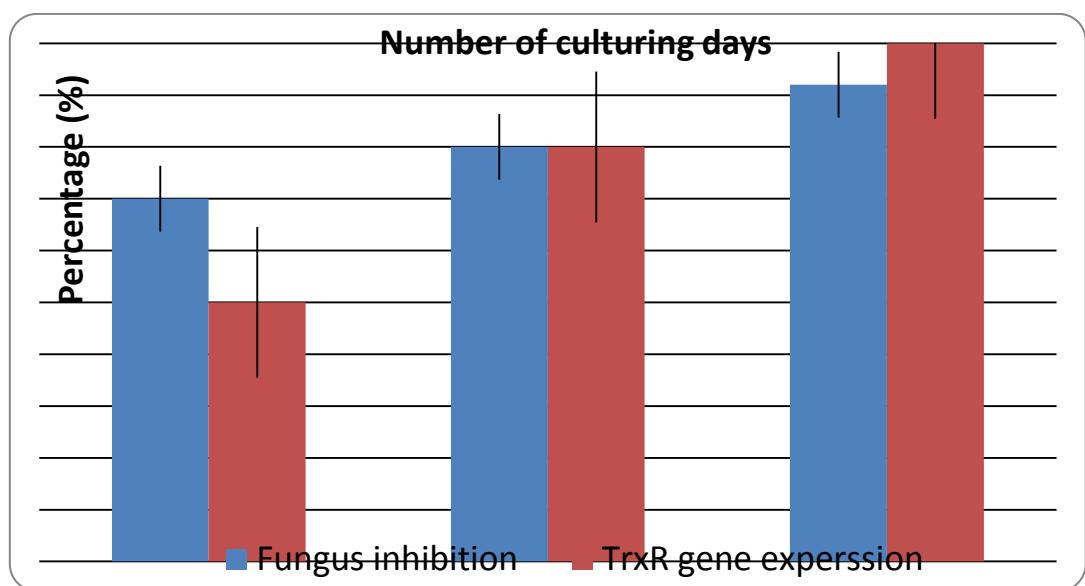


(B)

Figure 7



**Figure 8**



**Figure 9**