รหัสโครงการ : MRG5480289

ชื่อโครงการ : การสลับโครงสร้างไซโลกลูแคนที่แตกต่างกันระหว่างข้าวและอะราบิดอบซิสเพื่อบ่งชี้ หน้าที่ในผนังเซลล์พืช

ชื่อนักวิจัย : ดร. ศุภชัย วุฒิพงศ์ชัยกิจ

อีเมลล์ : fsciscv@ku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

บทคัดย่อ

ไซโลกลูแคนเป็นเฮมิเซลลูโลสที่มีความสำคัญต่อการทำหน้าที่ของผนังเซลล์ในการควบคุมการเจริญและพัฒนาของพืช การสังเคราะห์ไซโลกลูแคนประกอบไปด้วยเอนไซม์หลายชนิดที่ทำหน้าที่ร่วมกัน โดย xylosyltransferase (XXT) ทำหน้าที่สำคัญและมีผลต่อการควบคุมการสังเคราะห์ทั้งโครงสร้าง ไซโลกลูแคนมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน 2 ชนิดระหว่างพืชใบเลี้ยงคู่กับใบเลี้ยงเดี่ยว โดยคาดว่าเอนไซม์ *XXT* น่าจะเป็นตัวควบคุมความแตกต่างของโครงสร้างนี้ งานวิจัยนี้จึงเป็นการทดสอบถึงการควบคุมการสังเคราะห์ไซโลกลูแคนที่มีโครงสร้างที่แตกต่างกันโดยใช้อะราบิดอบซิสเป็นตัวแทนพืชใบเลี้ยงคู่และข้าวเป็นตัวแทนพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และศึกษาผลของการสลับโครงสร้างที่แตกต่างกันต่อการเจริญและพัฒนาของพืช งานวิจัยดำเนินการโดยการโคลนยีน *XXT* ทั้ง 5 ยีนจากข้าวแล้วถ่ายฝากเข้าสู่อะราบิดอบซิสายพันธุ์กลายที่มีการทำลายยีน *XXT* ของตนเองเพื่อให้เห็นผลยีนของการทำงานของยีนข้าว และถ่ายยีน *XXT* ของอะราบิดอบซิสเข้าสู่ข้าว จากการทดลองสามารถโคลนยีนข้าวและสร้างพลาสมิดสำหรับการถ่ายยีนได้แล้วทั้ง 5 ยีน ผลจาก RT-PCR ยืนยันได้ว่ายีนที่ถ่ายเข้าไปมีการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอจริง ส่วนการถ่ายยีนจากอะราบิดอพซิสเข้าสู่ข้าวนั้นมีอุปสรรคเนื่องจากจากการชักนำแคลลัสที่ได้รับยีนให้เป็นต้นนั้นมีอัตราส่วนที่ต่ำและผลจากน้ำท่วมทำให้การทดลองนี้ทำได้ไม่สำเร็จ เพื่อได้ข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับหน้าที่ของเอนไซม์ *XXT* ของข้าวผู้วิจัยได้ทำการผลิตโปรตีนชนิดนี้ใน *E. coli* และทำการแยกให้บริสุทธิ์ก่อนทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ แต่ตรวจไม่พบปฏิกิริยาของเอนไซม์นี้ ดังที่สามารถตรวจได้จากเอนไซม์ *XXT* ของอะราบิดอพซิส เมื่อตรวจสอบการสังเคราะห์ไซโลกลูแคนโดยยีนที่ถ่ายเข้าไปในต้นอะราบิดอบซิสพันธุ์กลายด้วยวิธีตรวจสอบทางอิมมูโนพบว่ายีน 3 ยีนจากข้าวสามารถสร้างไซโลกลูแคนได้ในสายพันธุ์กลายชนิด *xxt2 4 5* แต่ไม่สามารถสังเคราะห์ได้ในสายพันธุ์ *xxt1 xxt2* โดยตรวจสอบพบเฉพาะโมเลกุลแกนหลัก (backbone) แต่ตรวจไม่พบกิ่งด้านข้างของน้ำตาลฟูโคส ทั้งนี้เป็นการแสดงในขั้นต้นว่ายีนทั้ง 3 เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไซโลกลูแคนและสามารถสังเคราะห์ได้ในต้นอะราบิดอบซิส การทดลองต่อไปจะเป็นการรวบรวมอะราบิดอพซิสที่ได้รับการถ่ายยีนที่และเป็นสายพันธุ์แท้ (homozygous) ก่อนทำการวิเคราะห์การสังเคราะห์ไซโลกลูแคนและผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของต้นอะราบิดอบซิสต่อไป

คำสำคัญ : ผนังเซลล์ ไซโลกลูแคน การเจริญและพัฒนาของพืช

Abstract

Project Code : MRG5480289

Project Title : Swapping of different xyloglucan backbone structures between rice and Arabidopsis to indicate their functional roles in plant cell walls.

Investigator : Dr. Supachai Vuttipongchaikij

E-mail Address : fsciscv@ku.ac.th

Project Period : 2 years

Abstract

Xyloglucans (XyGs) are important hemicellulose polymers that play role in cell walls for controlling plant growth and development. A number of enzymes are required for coordinately synthesizing these polymers. Especially, xylosyltransferase is a key enzyme that responsible for the whole biosynthesis process. XyG structures have been divided into two groups based on their backbone structures between monocots and dicots, and it is believed that *XXTs* are likely to be the key enzyme for this difference. This project aims to characterize the function of rice *XXTs* in XyG biosynthesis and the role of different XyG structures in plant growth and development by using Arabidopsis and rice as models for dicots and monocots respectively. This work proceeds by cloning and overexpression of five rice *XXTs* in Arabidopsis *XXT* knockout mutants and, in parallel, expressing Arabidopsis *XXTs* in rice. Five rice *XXTs* were successfully cloned and a number of Arabidopsis transformants with rice *XXT* were selected. RT-PCR analysis indicated that the transferred genes were expressed at transcript levels. However, rice transformation by using Arabidopsis *XXTs* was unsuccessful due to low rate of shoot re-generation rate of transformed calli, and Thailand flood event in the past year. To gain more information from these genes, recombinant enzyme of five rice *XXTs* were produced by *E. coli* and enzyme activity was tested. However, no xylosyltransferase activity was detected, unlike what was previously observed by using Arabidopsis *XXT* recombinant enzymes. Immunolabelling using XyG specific antibodies in transformed Arabidopsis mutants showed that three rice *XXTs* could produce XyG in *xxt2 4 5* mutant but not in *xxt1 xxt2* mutants. The labeling also showed that the present of XyGs was due to the backbone structure, not for fucose side chains. This indicated that these three genes were indeed *XTTs* and could synthesize XyGs in Arabidopsis. Nevertheless, further studies from Arabidopsis transformed with rice *XXTs* are required especiallythose that involved analyzing xyloglucan biosynthesis and its impact on plant growth and development.

Key words: Plant cell wall, xyloglucan, plant growth and development