



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การสลับโครงสร้างไซโลกลูแคนที่แตกต่างกันระหว่างข้าวและอะราบิโดบซิสเพื่อบ่งชี้หน้าที่ในผนังเซลล์พืช

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

โดย

ดร. ศุภชัย วุฒิพงศ์ชัยกิจ

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ

มิถุนายน 2556

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การสลับโครงสร้างไซโลกลูแคนที่แตกต่างกันระหว่างข้าวและอะราบิโดบซิสเพื่อบ่งชี้หน้าที่ในผนังเซลล์พืช

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

ดร. ศุภชัย วุฒิพงศ์ชัยกิจ

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว และ สกอ ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รหัสโครงการ : MRG5480289

ชื่อโครงการ : การสลับโครงสร้างไซโลกลูแคนที่แตกต่างกันระหว่างข้าวและอะราบิโดบซิสเพื่อป้องกันผนังเซลล์พืช

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 งานวิจัยนี้จึงเป็นการทดสอบถึงการควบคุมการสังเคราะห์ไซโลกลูแคนที่มีโครงสร้างที่แตกต่างกันโดยใช้อะราบิโดบซิสเป็นตัวแทนพืชใบเลี้ยงคู่และข้าวเป็นตัวแทนพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และศึกษาผลของการสลับโครงสร้างที่แตกต่างกันต่อการเจริญและพัฒนาของพืช งานวิจัยดำเนินการโดยการโคลนยีน XXT ทั้ง 5 ยีนจากข้าวแล้วถ่ายฝากเข้าสู่อะราบิโดบซิสสายพันธุ์กลายที่มีการทำลายยีน XXT ของตนเองเพื่อให้เห็นผลยีนของการทำงานของยีนข้าว และถ่ายยีน XXT ของอะราบิโดบซิสเข้าสู่ข้าว จากการทดลองสามารถโคลนยีนข้าวและสร้างพลาสมิดสำหรับการถ่ายยีนได้แล้วทั้ง 5 ยีน ผลจาก RT-PCR ยืนยันได้ว่ายีนที่ถ่ายเข้าไปมีการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอจริง ส่วนการถ่ายยีนจากอะราบิโดบซิสเข้าสู่ข้าวนั้นมีอุปสรรคเนื่องจากจากการชักนำแคลลัสที่ได้รับยีนให้เป็นต้นนั้นมีอัตราส่วนที่ต่ำและผลจากน้ำท่วมทำให้การทดลองนี้ทำได้ไม่สำเร็จ เพื่อได้ข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับหน้าที่ของเอนไซม์ XXT ของข้าวผู้วิจัยได้ทำการผลิตโปรตีนชนิดนี้ใน *E. coli* และทำการแยกให้บริสุทธิ์ก่อนทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ แต่ตรวจไม่พบปฏิกิริยาของเอนไซม์นี้ ดังที่สามารถตรวจได้จากเอนไซม์ XXT ของอะราบิโดบซิส เมื่อตรวจสอบการสังเคราะห์ไซโลกลูแคนโดยยีนที่ถ่ายเข้าไปในต้นอะราบิโดบซิสพันธุ์กลายด้วยวิธีตรวจสอบทางอิมมูโนพบว่ายีน 3 ยีนจากข้าวสามารถสร้างไซโลกลูแคนได้ในสายพันธุ์กลายชนิด xxt2 4 5 แต่ไม่สามารถสังเคราะห์ได้ในสายพันธุ์ xxt1 xxt2 โดยตรวจสอบพบเฉพาะโมเลกุลแกนหลัก (backbone) แต่ตรวจไม่พบกิ่งด้านข้างของน้ำตาลฟูโคส ทั้งนี้เป็นการแสดงในขั้นต้นว่ายีนทั้ง 3 เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไซโลกลูแคนและสามารถสังเคราะห์ได้ในต้นอะราบิโดบซิส การทดลองต่อไปจะเป็นการรวบรวมอะราบิโดบซิสที่ได้รับการถ่ายยีนที่เป็นสายพันธุ์แท้ (homozygous) ก่อนทำการวิเคราะห์การสังเคราะห์ไซโลกลูแคนและผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของต้นอะราบิโดบซิสต่อไป

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 especially those that involved analyzing xyloglucan biosynthesis and its impact on plant growth and development.

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

บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

โครงการนี้เป็นโครงการสำหรับนักวิจัยรุ่นใหม่ กำหนดระยะเวลา 2 ปี เงินทุนสนับสนุนจำนวน 480,000 บาท โครงการนี้มีจุดประสงค์เพื่อที่ศึกษาหน้าที่การทำงานของเอนไซม์ xyloglucan xylosyltransferase ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์โมเลกุลไซโลกลูแคนในผนังเซลล์ซึ่งคาดว่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืช และเนื่องจากโครงสร้างของโมเลกุลไซโลกลูแคนนี้ในกลุ่มพืชใบเลี้ยงคู่กับใบเลี้ยงเดี่ยวแตกต่างกันจึงคาดว่าความแตกต่างนี้จะส่งผลที่แตกต่างกันในพืชด้วย งานวิจัยนี้เป็นการทดสอบถึงการควบคุมการสังเคราะห์ไซโลกลูแคนที่มีโครงสร้างที่แตกต่างกันโดยใช้อะราบิโดบซิสเป็นตัวแทนพืชใบเลี้ยงคู่และข้าวเป็นตัวแทนพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และศึกษาผลของการสลับโครงสร้างที่แตกต่างกันต่อการเจริญและพัฒนาของพืช งานวิจัยดำเนินการโดยการโคลนยีน *XXT* ทั้ง 5 ยีนจากข้าวแล้วถ่ายฝากเข้าสู่อะราบิโดบซิสสายพันธุ์กลายที่มีการทำลายยีน *XXT* ของตนเองเพื่อให้เห็นผลยืนของการทำงานของยีนข้าว และถ่ายยีน *XXT* ของอะราบิโดบซิสเข้าสู่ข้าว จากการทดลองสามารถโคลนยีนข้าวและสร้างพลาสมิดสำหรับการถ่ายยีนได้แล้วทั้ง 5 ยีน ผลจาก RT-PCR ยืนยันได้ว่ายีนที่ถ่ายเข้าไปมีการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอจริง ส่วนการถ่ายยีนจากอะราบิโดบซิสเข้าสู่ข้าวนั้นมีอุปสรรคเนื่องจากจากการชักนำแคลลัสที่ได้รับยีนให้เป็นต้นนั้นมีอัตราส่วนที่ต่ำและผลจากน้ำท่วมทำให้การทดลองนี้ทำได้ไม่สำเร็จ เพื่อได้ข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับหน้าที่ของเอนไซม์ *XXT* ของข้าวผู้วิจัยได้ทำการผลิตโปรตีนชนิดนี้ใน *E. coli* และทำการแยกให้บริสุทธิ์ก่อนทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ แต่ตรวจไม่พบปฏิกิริยาของเอนไซม์นี้ ดังที่สามารถตรวจได้จากเอนไซม์ *XXT* ของอะราบิโดบซิส เมื่อตรวจสอบการสังเคราะห์ไซโลกลูแคนโดยยีนที่ถ่ายเข้าไปในต้นอะราบิโดบซิสพันธุ์กลายพบว่ายีน 3 ยีนจากข้าวสามารถสร้างไซโลกลูแคนได้ในสายพันธุ์กลายชนิด *xxt2* 4 5 แต่ไม่สามารถสังเคราะห์ได้ในสายพันธุ์ *xxt1* *xxt2* โดยตรวจสอบพบเฉพาะโมเลกุลแกนหลัก (backbone) แต่ตรวจไม่พบกิ่งด้านข้างของน้ำตาลฟูโคส ทั้งนี้เป็นการแสดงในขั้นต้นว่ายีนทั้ง 3 เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไซโลกลูแคนและสามารถสังเคราะห์ได้ในต้นอะราบิโดบซิส การทดลองต่อไปจะเป็นการรวบรวมอะราบิโดบซิสที่ได้รับการถ่ายยีนที่เป็นสายพันธุ์แท้ (homozygous) ก่อนทำการวิเคราะห์การสังเคราะห์ไซโลกลูแคนและผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของต้นอะราบิโดบซิสต่อไป ผลงานส่วนหนึ่งในงานวิจัยนี้ได้ตีพิมพ์ลงในวารสารระดับนานาชาติจำนวน 1 ฉบับ

Vuttipongchaikij, S., Brocklehurst, D., Steele-King, C., Ashford, D.A., Gomez, L.D., McQueen-Mason, S.J. 2012. Arabidopsis GT34 family contains five xyloglucan α -1,6-xylosyltransferases. New Phytologist. Vol. 195 (3): 585-595.

วัตถุประสงค์งานวิจัย

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาหน้าที่การทำงานของเอนไซม์โมเลกุลของไซโลกลูแคน ที่มีปริมาณและโครงสร้างที่แตกต่างกันระหว่างข้าวและอะราบิโดบซิสต่อการทำหน้าที่ในผนังเซลล์และต่อการเจริญเติบโต สามารถแบ่งออกเป็นวัตถุประสงค์ย่อยดังนี้

1. เพื่อพิสูจน์หน้าที่การทำงานของยีนข้าว 5 ยีน ที่เป็นโฮโมล็อกกับยีน *XXT* ของอะราบิโดบซิส
2. เพื่อ สลับ หรือ แลกเปลี่ยน โมเลกุลไซโลกลูแคนระหว่างข้าวและอะราบิโดบซิส โดยการถ่ายยีน *XXT* จากข้าวเข้าอะราบิโดบซิสสายพันธุ์กลาย และจากอะราบิโดบซิสเข้าสู่ข้าว
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติที่แตกต่างกันของโมเลกุลไซโลกลูแคนทั้ง 2 ชนิด ที่มีต่อผนังเซลล์
4. เพื่อตรวจสอบผลของโมเลกุลไซโลกลูแคนทั้ง 2 ชนิด ต่อการเจริญและการเพิ่มขนาดของเซลล์พืช

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. โคลนยีน xylosyltransferase (*XXTs*) จากข้าว
2. ถ่ายยีน xylosyltransferase จากข้าว เข้าสู่อะราบิโดบซิสสายพันธุ์กลายที่ไม่สามารถสร้างไซโลกลูแคน เพื่อทดสอบหน้าที่ของเอนไซม์
3. ถ่ายยีน xylosyltransferase จากอะราบิโดบซิส เข้าสู่ข้าว
4. ตรวจสอบการสร้างไซโลกลูแคนในอะราบิโดบซิส และข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน
5. ตรวจสอบการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงของอะราบิโดบซิสและข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน

บทนำ

ไซโลกลูแคน (xyloglucan) เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นส่วนประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ในผนังเซลล์ของพืชใบเลี้ยงคู่ โดยมีสัดส่วนเป็น 15-25% ของมวลของผนังเซลล์ ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมต่อนี้ของระหว่างสายใยเซลลูโลส (cellulose microfibril) หลายๆสายเข้าด้วยกันเพื่อยึดโครงสร้างผนังเซลล์ให้มีความมั่นคง (Carpita and Gilbeaut, 1993) ไซโลกลูแคนได้มีการศึกษามานานกว่า 20 ปีและพบว่ามีข้องเกี่ยวกับการเจริญและการขยายขนาดของเซลล์ในส่วนของการควบคุมการยืดขยายของผนังเซลล์ โดยในขณะที่เซลล์กำลังมีการขยายตัวหลังจากเกิดการแบ่งเซลล์ โพลีแซคคาไรด์ชนิดนี้จะถูกตัดและดัดแปลงเพื่อให้โครงสร้างของผนังเซลล์มีความยืดหยุ่นและสามารถยืดขยายเพื่อรองรับขนาดของเซลล์ในขั้นสุดท้ายได้ (Cosgrove, 2005) โดยในขั้นตอนการขยายของเซลล์จะถูกควบคุมด้วยการทำงานของเอนไซม์ 3 กลุ่มใหญ่ คือ expansins (McQueen-Mason et al. 1992), xyloglucan endotransglucosyl/hydrolases (XTHs; Fry et al., 1992) และ endo-glucanases โดยแต่ละกลุ่มประกอบด้วยเอนไซม์หลายๆชนิด (protein family) ที่ทำงานพร้อมๆกัน และเอนไซม์ทั้งสามกลุ่มนี้ได้มีการพิสูจน์แล้วว่ามียีนที่ทำงานที่จำเพาะกับไซโลกลูแคน ล่าสุดจากการศึกษาของผู้ออกทุนวิจัยในช่วงการทำวิทยานิพนธ์ปริญญาเอกโดยการยับยั้งหน้าที่ของยีนที่สร้างเอนไซม์ xylosyltransferase ที่ทำหน้าที่สร้างไซโลกลูแคนในอะราบิโดบซิสพบว่า การสร้างไซโลกลูแคนในพืชนั้นได้ถูกยับยั้งและทำให้พืชหยุดการเจริญเติบโตโดยที่พืชนั้นมีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นแต่เซลล์ไม่สามารถขยายขนาดและไม่สามารถพัฒนาไปสู่เนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่ได้ ซึ่งแสดงถึงความสำคัญของโพลีแซคคาไรด์ชนิดนี้ต่อการเจริญเติบโตของพืช

อย่างไรก็ตามในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในวงศ์ Poaceae เช่น ข้าว และหญ้า ซึ่งมีความสำคัญต่อประเทศไทยและประเทศในเอเชียในฐานะอาหารของชาติและพืชอาหารสัตว์ที่สำคัญนั้นไซโลกลูแคนที่มีโครงสร้างที่แตกต่างออกไปจากของพืชใบเลี้ยงคู่ และสัดส่วนของไซโลกลูแคนในผนังเซลล์นั้นมีอยู่ในปริมาณที่ต่ำ (น้อยกว่า 5%) และน้อยกว่าเฮมิเซลลูโลสชนิดอื่นๆในผนังเซลล์ซึ่งอาจบ่งบอกถึงความสำคัญที่ด้อยกว่าของโพลีแซคคาไรด์ชนิดนี้ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Carpita and Gilbeaut, 1993) อย่างไรก็ตามทฤษฎีนี้ยังมิได้มีการพิสูจน์ และหลักฐานที่แสดงถึงความสำคัญของไซโลกลูแคนก็เพิ่งมีแสดงให้เห็นเมื่อไม่นานมานี้ เช่น การพบยีนที่เป็นโฮโมล็อก (homolog) ของการสังเคราะห์ไซโลกลูแคนในจำนวนที่เท่าๆกันของอะราบิโดบซิสและข้าว และการพบจำนวนของยีนและการปริมาณการแสดงออกที่ใกล้เคียงกันของยีนที่สร้างเอนไซม์ที่ทำงานเกี่ยวข้องกับไซโลกลูแคนทั้งสามกลุ่มในข้าวตัน (Yokoyama et al., 2004) expansins, XTHs และ endo-glucanasesระหว่างอะราบิโดบซิสและข้าว (ถึงแม้ว่าโครงสร้างทางโมเลกุลของไซโลกลูแคนในพืชชนิดต่างๆได้มีการศึกษาอย่างละเอียด แต่ความรู้เชิงลึกในกลไกของการสังเคราะห์และหน้าที่การทำงานนั้นยังมีน้อยและยีนหลายๆ กลุ่มที่ผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์นี้ก็เพิ่งจะมีการค้นพบในช่วงเวลาที่ผ่านมาไม่นาน (Faik et al., 2002; Vanzin et al., 2002; Madson et al., 2003; Cavalier and Keegstra, 2006; Cocuron et al., 2007) จากการศึกษากการสังเคราะห์ด้วยการทำลายหน้าที่ยีนเหล่านี้ในอะราบิโดบซิสด้วย T-DNA พบว่ายีนที่ผลิตเอนไซม์ xylosyltransferase ซึ่งสร้างกิ่งแขนง (side chain) ตัวแรกของโมเลกุลเป็นยีนสำคัญที่จะกำหนดการสร้างหรือการยับยั้งการสร้างของทั้งโมเลกุลวิธีนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาถึงหน้าที่ของไซโลกลูแคนโดยการศึกษาถึงผลกระทบจากการขาดหายไปของโมเลกุลนี้ในพืช ด้วยเหตุที่ความรู้เกี่ยวกับการทำหน้าที่ของไซโลกลูแคนในผนังเซลล์ที่มีต่อการ

เจริญเติบโตของพืชนั้นยังมีน้อยมากและไม่เพียงพอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชวงศ์หญ้าซึ่งมีโครงสร้างของไซโลกลูแคนที่มีลักษณะพิเศษแตกต่างจากพืชในวงศ์อื่นๆ ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จะเป็นการศึกษาเปรียบเทียบการทำงานระหว่างไซโลกลูแคนจากข้าวและจากอะราบิดอปซิส โดยจะมุ่งเน้นในการตรวจสอบผลของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและปริมาณของโพลีแซคคาไรด์ชนิดนี้ต่อการเจริญเติบโต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขั้นตอนการขยายตัวของเซลล์ เพื่อที่จะเข้าใจถึงหน้าที่และกลไกการทำงาน

จากการที่จีโนมของข้าวนั้นเป็นที่ทราบและลำดับเบสได้ถูกวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนที่ได้มีการศึกษามาแล้ว พบว่าข้าวนั้นมีอยู่ ยีนที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกับยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ xyloglucan xylosyltransferase (XXT) ในอะราบิดอปซิส (Faik et. al., 2002; Cavalier and Keegstra, 2006) ซึ่งมีอยู่ ยีน 5 เช่นเดียวกัน โดยยีนเหล่านี้ได้ถูกจัดอยู่ใน glycosyltransferase family 34 ใน CAZy database จึงมีความเป็นไปได้สูงที่ยีนทั้ง ยีนนี้จากข้าวจะเป็นยีนที่ทำหน้าที่ในการสร้างไซโลกลูแคน ดังที่ได้มีการศึกษาในอะราบิดอปซิส 5 ดังนั้นในการศึกษาค้นหานี้ยีนทั้งห้าตัวจะถูกใช้ทดสอบในการทำหน้าที่และใช้ในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและปริมาณของไซโลกลูแคนในพืชระหว่างข้าวและอะราบิดอปซิส

จากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ xylosyltransferase ในอะราบิดอปซิสซึ่งพบว่าเอนไซม์นี้เป็นตัวที่กำหนดการสร้างของไซโลกลูแคนทั้งโมเลกุล ทำให้สามารถตั้งสมมุติฐานได้ว่าเอนไซม์ตัวนี้น่าจะเป็นตัวสำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างไซโลกลูแคนที่ทำให้มีโครงสร้างหลักและสัดส่วนในผนังเซลล์ที่ต่างกัน ดังที่พบในพืชวงศ์หญ้าเปรียบเทียบกับอะราบิดอปซิส ดังนั้นการเลือกใช้ยีนที่สร้างเอนไซม์นี้จากข้าวหรือจากอะราบิดอปซิสก็น่าที่จะสามารถนำมาใช้ในการถ่ายยีนสู่พืชต่างชนิดกันเพื่อปรับเปลี่ยนของไซโลกลูแคนในพืชได้ ยกตัวอย่างเช่น การนำยีนนี้จากอะราบิดอปซิสมาแสดงออกในข้าว หรือนำยีนนี้จากข้าวมาแสดงออกในอะราบิดอปซิส จากหลักฐานในเรื่องความสำคัญของไซโลกลูแคนในการเจริญเติบโตของพืชใบเลี้ยงคู่ และในเรื่องของปริมาณและการแสดงออกของยีนซึ่งทำงานโดยตรงกับไซโลกลูแคนและเกี่ยวข้องกับการขยายตัวของผนังเซลล์ในพืชวงศ์หญ้า (Cosgrove and Li, 1993) ทำให้สามารถสร้างสมมุติฐานถึงความเป็นไปได้ในความสำคัญของไซโลกลูแคนในการเจริญเติบโตในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในวงศ์หญ้า ซึ่งคาดว่าจะมีหน้าที่สำคัญในช่วงการขยายตัวภายหลังจากการแบ่งเซลล์ โดยโครงสร้างที่แตกต่างของไซโลกลูแคนในข้าวและหญ้านั้นอาจเป็นจุดสำคัญที่ทำให้โพลีเมอร์ชนิดนี้สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าโครงสร้างที่พบในพืชใบเลี้ยงคู่ และในสัดส่วนที่มีเพียงเล็กน้อยก็เพียงพอกับความต้องการของหน้าที่นี้ในผนังเซลล์ นอกจากนี้จากหลักฐานที่ว่าด้วยโครงสร้างของโพลีเมอร์ชนิดนี้ที่มีความสำคัญในการขยายตัวของเซลล์ การดัดแปลงของโครงสร้างหรือการเปลี่ยนสัดส่วนภายในผนังเซลล์อาจจะใช้เป็นเครื่องมือในการเพิ่มขนาดของเซลล์พืชได้ โดยอีกนัยหนึ่งคือการเพิ่มขนาดของพืช ซึ่งสามารถนำสู่การเพิ่มชีวมวล (biomass) ได้

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผนังเซลล์และการเจริญเติบโตของพืช

ผนังเซลล์เป็นหนึ่งในองค์ประกอบหลักของเซลล์พืช นอกจากคุณสมบัติที่มีความแข็งแรงและคงตัวเพื่อหน้าที่ในการปกป้องเซลล์จากสิ่งแวดล้อมและแรงดันภายในของเซลล์พืชเองแล้ว ผนังเซลล์ยังมีความสำคัญในการควบคุมการพัฒนาและการเจริญเติบโตของพืช ในเซลล์ที่กำลังมีการเจริญและการขยายขนาดหลังจากการแบ่งเซลล์ผนังเซลล์จะต้องมีการเปลี่ยนแปลงไปสู่ระยะที่มีความอ่อนตัวเพื่อการยืดและขยายของโครงสร้างในการตอบรับกับการขยายตัวของเซลล์จากแรงดันออสโมติก ในขณะเดียวกันผนังเซลล์ที่กำลังมีการยืดขยายก็ยังคงต้องรักษาความคงตัวของโครงสร้างเพื่อควบคุมทิศทางการขยายตัวในการนำไปสู่การกำหนดรูปร่างของเซลล์ ซึ่งมีผลต่อการพัฒนาไปสู่การสร้างเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่มีหน้าที่จำเพาะต่อไป (Cosgrove, 1999)

ผนังเซลล์ของพืชมีโพลีแซคคาไรด์หลายชนิดรวมกันเป็นองค์ประกอบหลัก และมีโปรตีน, เอนไซม์ และสารประกอบอื่นๆ เป็นองค์ประกอบย่อย ผนังเซลล์ของพืชสามารถแบ่งออกเป็นสองชนิดตามการพัฒนาของเซลล์ คือผนังเซลล์ชั้นปฐมภูมิ (primary cell walls) และผนังเซลล์ชั้นทุติยภูมิ (secondary cell walls) ผนังเซลล์ปฐมภูมิจะพบได้ที่เซลล์ที่เพิ่งจะมีการแบ่งตัวใหม่ๆ และเซลล์พืชทั่วไปที่มีผนังบาง ส่วนผนังเซลล์ทุติยภูมิจะพบได้ที่เซลล์พืชที่มีการเจริญเติบโตในขั้นที่สอง (secondary growth) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อท่อลำเลียง (vascular tissues) (Carpita and Gilbeaut, 1993)

ผนังเซลล์ปฐมภูมียังถูกแบ่งเป็นอีกสองชนิดตามส่วนประกอบ คือ ผนังเซลล์ชั้นปฐมภูมิชนิดที่หนึ่ง (type I) ซึ่งมีเซลลูโลส, ไชโลกลูแคน (xyloglucans) และเพคติน (pectins) ในสัดส่วนที่เท่ากันเป็นองค์ประกอบ และผนังเซลล์ชั้นปฐมภูมิชนิดที่สอง (type II) ซึ่งมีกลูคูโรโนอะราบินโนไซแลน (glucuronoarabinoxylans; GAXs) และกลูแคนสายผสม (mixed linkage glucans) เป็นส่วนประกอบหลักแทนที่ไชโลกลูแคนซึ่งยังคงเหลือในสัดส่วนต่ำ และมีเพคตินในสัดส่วนที่ต่ำ โดยชนิดที่หนึ่งจะพบได้ในพืชใบเลี้ยงคู่และใบเลี้ยงเดี่ยวที่ไม่ใช่พืชตระกูลหญ้า ส่วนชนิดที่สองจะพบได้เฉพาะในพืชตระกูลหญ้าเท่านั้น โดยทั่วไปโครงสร้างของผนังเซลล์ปฐมภูมิชนิดที่หนึ่งนั้นประกอบด้วยเส้นใยเซลลูโลส (cellulose microfibrils) ที่เรียงขนานกันเป็นทางยาวเปรียบดังกำแพงลวดที่มีเสาไม้เรียงกันเป็นแกนของโครงสร้าง และมีไชโลกลูแคนเชื่อมต่อระหว่างเส้นใยเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจนในการสร้างโครงร่างที่ต่อกันเปรียบดังสายลวดของกำแพง และมีเพคตินที่ถูกเติมในช่องว่างระหว่างส่วนที่เชื่อมต่อกันของเส้นใยเซลลูโลสเพื่อเสริมความแข็งแรงของโครงสร้าง ส่วนโครงสร้างของผนังเซลล์ชนิดที่สองนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ด้วยสัดส่วนของเฮมิเซลลูโลสซึ่งจะมี GAXs และกลูแคนสายผสมในสัดส่วนที่สูงมากทำให้มีการคาดว่าโพลีแซคคาไรด์สองชนิดนี้น่าที่จะทำหน้าที่เป็นเชื่อมต่อสายใยเซลลูโลสแทนที่ไชโลกลูแคน อย่างไรก็ตามทฤษฎีนี้ก็ยังไม่ได้มีการพิสูจน์ (Carpita and Gilbeaut, 1993)

ไชโลกลูแคน โครงสร้างและการสังเคราะห์

ไชโลกลูแคนเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่พบในผนังเซลล์ของพืชบกทุกชนิดและยกเว้นเพียงสาหร่ายสีเขียวบางชนิดที่ไม่พบ (Popper and Fry, 2003) มีความยาวของโมเลกุลที่หลากหลายรวมกันอยู่ในผนังเซลล์เดียวกันตั้งแต่นาโนเมตร โดยโมเลกุลส่วนใหญ่จะ 700 ถึง 20 ยาว) นาโนเมตร 200McCann et al., (1990) ในพืชทั่วไปทั้งใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่มีไชโลกลูแคนที่มีโครงสร้างประกอบไปด้วยแกนของโครงสร้างที่เป็นโพลีเมอร์สายตรง

ยาวของ β -1,4-glucan ที่ถูกเติมด้วย α -1,6-xylose บนกลูโคสสามโมเลกุลที่ติดกันโดยมีการเว้นช่วงหนึ่งโมเลกุลที่ไม่มีการเติมระหว่างกลุ่มโมเลกุลที่ถูกเติม และโมเลกุลของไซโลสที่ตำแหน่งที่สองและสามยังเติมต่อด้วย α -1,2-galactose และโมเลกุลกาแลคโตสบนไซโลสในตำแหน่งที่สามอาจเติมต่อด้วย α -1,2-fucose ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและบางครั้งขึ้นกับชนิดของเซลล์ที่แตกต่างกัน (Hayashi, 1989) นอกจากนี้โมเลกุลกาแลคโตสยังมีการเติมด้วยหมู่อะซิดิลซึ่งพบในปริมาณที่มากถึง 80% ของหมู่กาแลคโตสทั้งหมด แต่พืชในวงศ์ Poaceae and Solanaceae พบว่ามีโครงสร้างที่แตกต่างกันคือ มีการเติม 1,6-xylose บนสายกลูแคนเพียงสองโมเลกุลและโดยส่วนใหญ่มีการคั่นด้วยสองโมเลกุลที่ไม่มีการเติม หรือส่วนน้อยคั่นด้วยหลายๆโมเลกุลที่ไม่มีการเติมหมู่ไซโลสเลย นอกจากนี้หมู่ไซโลสยังสามารถถูกเติมต่อด้วยน้ำตาล L-arabinose (Vincken et al., 1997)

ในการสังเคราะห์ผนังเซลล์นั้นสายใยเซลลูโลสจะมีการสังเคราะห์ขึ้นบนผิวด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ด้วยเอนไซม์เชิงซ้อนที่แทรกอยู่ในชั้นของเยื่อหุ้ม แต่ไซโลกลูแคนนั้นมีการสังเคราะห์ที่แตกต่างกัน เอนไซม์หลายๆ ชนิดที่ทำหน้าที่สังเคราะห์จะทำงานอยู่ด้านในของ Golgi apparatus และเมื่อไซโลกลูแคนได้ถูกสังเคราะห์เสร็จสิ้นก็ถูกขนส่งไปสู่ภายนอกเซลล์ด้วย vesicle transport ก่อนที่จะรวมตัวกับสายใยเซลลูโลสเพื่อสร้างโครงสร้างของผนังเซลล์ โดยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ไซโลกลูแคนนั้นประกอบด้วยเอนไซม์อย่างน้อยห้าชนิด คือ glucan synthase (Cocuron et al., 2007) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สร้าง β -1,4-glucan ซึ่งเป็นแกนของโครงสร้าง xylosyltransferase (Faik et al., 2002; Cavalier and Keegstra, 2006) ซึ่งทำหน้าที่เติมน้ำตาลไซโลสเข้าไปที่แกนของโครงสร้าง galactosyltransferase (Madson et al., 2003) fucosyltransferase (Vanzin et al., 2002) และ arabinosyltransferase ซึ่งทำหน้าที่เติมน้ำตาลกาแลคโตส ฟูโคส และอะราบินอสเข้าสู่โมเลกุลตามลำดับ

หน้าที่ของไซโลกลูแคน

ไซโลกลูแคนได้ถูกเสนอให้เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีความสำคัญต่อการสร้างโครงสร้างและการคงรูปของผนังเซลล์โดยการเชื่อมต่อกับสายใยเซลลูโลสเข้าด้วยกันและทำหน้าที่ในการรองรับและตอบรับแรงกลต่างๆมากระทำ (Pauly et al., 1999, Cosgrove, 1999) ทั้งเกิดขึ้นจากภายในเซลล์เองและจากภายนอก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงที่ผนังเซลล์กำลังมีการยืดขยายในขณะที่มีการขยายตัวของเซลล์ ทฤษฎีความสำคัญของไซโลกลูแคนนี้ได้สนับสนุนจากการศึกษาเอนไซม์หลายชนิดที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขยายตัวของเซลล์และควบคุมการเจริญของพืช และพบว่าเอนไซม์เหล่านี้มีการทำงานโดยตรงกับไซโลกลูแคน (Cosgrove, 2005) ได้แก่ expansins (McQueen-Mason et al., 1992ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ควบคุมการยืดขยายของผนังเซลล์ในทุกส่วนของพืชด้วยการทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างไซโลกลูแคนกับสายใยเซลลูโลส และดึง (ไม่มีการตัดสายไซโลกลูแคน) ผนังเซลล์มีการสายไซโลกลูแคนให้จับกับสายใยเซลลูโลสน้อยลงมีผลให้โครงสร้างจัดตัวแบบหลวมๆเพื่อพร้อมในการยืดขยาย xyloglucan endo-transgluco/hydrolases (XETs) (Fry et al., 1992) ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมการยืดขยายของผนังเซลล์เช่นเดียวกับ expansin แต่การทำงานจะเป็นการตัดสายไซโลกลูแคนให้เป็นสายสั้นๆและนำมาต่อเชื่อมกันเป็นสายใหม่ที่ขนาดต่าง ๆ กัน เพื่อจัดเรียง (ส่วนใหญ่เพื่อเพิ่มความยาวของโมเลกุล)

โครงสร้างของผนังเซลล์ใหม่ให้มีความเหมาะสมกับเซลล์ที่จะขยายขนาดไปสู่ และ endo-glucanase ซึ่งจะทำหน้าที่ควบคุมไปกับเอนไซม์สองชนิดในขั้นต้นแต่การทำงานจะเป็นการตัดสายไซโลกลูแคนเพียงอย่างเดียวเพื่อ

คลายความแข็งของโครงสร้างผนังเซลล์เพื่อรองรับการยืดขยาย นอกจากนี้เอนไซม์ทั้งสามชนิดนี้ยังมีหน้าที่ในการควบคุมการสุกของผล (fruit ripening) และการเหี่ยวหรือหลุดร่วงของเนื้อเยื่อพืช (abscission) ซึ่งเกี่ยวข้องกับ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไซโทสเกเลตันในผนังเซลล์ (Rose and Bennett, 1999)

ระเบียบวิธีวิจัย

การโคลนยีนจากข้าว (*Oryza sativa* L. var. Nipponbare) และสร้างพลาสมิดสำหรับการถ่ายยีนในอะราบิโดบซิส ทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากต้นอ่อนข้าวที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 2 สัปดาห์โดยใช้ RNeasy Kit (Qiagen) แล้วทำการสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ อาร์เอ็นเอที่สกัดได้ 1 µg บ่มกับ 10 mM dNTP oligo-d(T) primer และเอนไซม์ reverse transcriptase (invitrogen) และหลังจากนั้นทำการโคลนยีนจาก cDNA ที่สังเคราะห์ได้โดยการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *XXT* ของข้าวทั้ง 5 ยีน ต่อมาทำการตรวจสอบผลของการเพิ่ม ปริมาณด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสและทำการโคลนเข้า pGEMTeasy เวกเตอร์ ด้วยวิธี TA cloning เมื่อ คัดเลือกโคลนได้จึงทำการตรวจสอบยืนยันด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและวิเคราะห์ลำดับเบส

ในส่วนของการสร้างพลาสมิดสำหรับถ่ายยีนทำโดยการตัดช่องยีนที่โคลนมาต่อกับ pENTR เวกเตอร์ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว จึงทำการย้ายชิ้นส่วนยีนเข้าสู่พลาสมิดสำหรับการถ่ายยีน pH2GW7 ด้วยเอนไซม์ Clonase (Invitrogen) หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยาย้ายชิ้นส่วนดีเอ็นเอแล้วก็ทำการถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* แล้ว ทำการคัดเลือกด้วยยาปฏิชีวนะและวิธีพีซีอาร์ก่อนที่จะนำพลาสมิดที่คัดเลือกได้ถ่ายเข้าสู่ *Agrobacterium* สาย พันธุ์ LHA105

การผลิตโปรตีนใน *E. coli* และการทำให้บริสุทธิ์

ทำการสร้างพลาสมิดสำหรับสร้างโปรตีนโดยการโคลนเฉพาะชิ้นส่วนหลังจาก signal peptide ถึง stop codon โดยการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ที่เจาะจงกับตำแหน่งเฉพาะที่ต้องการแล้วทำการโคลนเข้า pGemTeasy vector ตรวจสอบลำดับเบสที่ถูกต้องก่อนทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเชื่อมต่อเข้ากับ pGEX vector แล้วคัดเลือกโคลนที่ถูกต้องโดยวิธีพีซีอาร์ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ต่อมานำพลาสมิดที่คัดเลือกได้ ถ่ายเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 แล้วคัดเลือกโคลนด้วยพีซีอาร์

ต่อมาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่คัดเลือกได้เพื่อผลิตโปรตีนโดยเลี้ยงในอาหาร 2X YT เป็นเวลา 2 วัน ก่อนเติม IPTG ที่ความเข้มข้น 100 µM แล้วเลี้ยงต่ออีก 1 วัน ต่อมาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง แล้ว ทำให้เซลล์แตกโดยใช้ lysozyme ร่วมกับแรงดัน osmotic และทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยใช้ Sepharose 4B เพื่อจับ tag ที่ติดอยู่กับโปรตีนที่ผลิตได้ ทำการล้างและชะโปรตีนออกจาก Sepharose 4B ตรวจสอบโปรตีนที่ ได้ด้วย SDS-PAGE และวัดปริมาณโดย Bradford assay

การตรวจสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์

ตรวจสอบปฏิกิริยาการของเอนไซม์ในการสลายหมู่น้ำตาลไซโลสเข้าสู่เซลโลเฮกซะออส (cellohexaose) โดยบ่มเอนไซม์ที่สกัดได้ประมาณ 0.3 µg ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 50 ที่ประกอบด้วยหัวโม่ในชุดปฏิกิริยา 18

mM PIPES pH 6.9, 0.5mM UDP-sugar (Xyl, Gal or Glu), 20mM β -mercaptoethanol, 150 μ g oligo/polysaccharide acceptors: or cellohexaose, 5mM MgCl₂, 5mM MnCl₂ and 0.37KBq of UDP-[14C] sugar (Xyl, Gal or Glu) ในปริมาตรรวม 25 μ l แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยวิธี TLC ที่ดัดแปลงมาจาก Robyt & Mukerjee (1994 and Atichokdomchai et al. (2006) โดยใช้ Whatman TLC K 5 chromatography (silica-gel) plates และ mobile phase คือ acetonitrile: 1-propanol: water: ethyl acetate (85:50:50:25) เป็นเวลา ชั่วโมง แล้วทำการตรวจสอบสารก้ำมันตรังสีโดยใช้ 2-phosphorscreen ทาบลงบน TLC plat เป็นเวลา 16 ชั่วโมงแล้วตรวจสอบสัญญาณด้วยเครื่อง Phosphorimager (BIO-RAD และตรวจสอบตำแหน่งของ เซลโลเฮกซะโอสบน TLC plat โดยการย้อมด้วย) %0.1w/v) α -naphthol and) %5v/v) sulphuric acid และบ่มที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา นาที 10

การถ่ายยีนและการคัดเลือกอะราบิโดบซิสสายพันธุ์กลาย

การถ่ายยีนเข้าสู่อะราบิโดบซิสเริ่มจากการปลูกอะราบิโดบซิสจนกระทั่งออกดอกแล้วทำการจุ่มดอกลงในสารแขวนลอยอะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิดสำหรับการถ่ายยีนในสารละลาย 5% sucrose แล้วเพาะเลี้ยงต่อจนเก็บเมล็ดได้ เมื่อได้เมล็ดแล้วจึงทำการคัดเลือกโดยการเพาะเมล็ดที่ได้รับการถ่ายยีนลงในอาหาร 1/2 MS ที่เติม 35 μ g/ml hygromycin B และจะสามารถคัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่ายยีนหลังเพาะเลี้ยงประมาณ 2 สัปดาห์ การคัดเลือกสายพันธุ์แท้ทำได้โดยการคัดเลือกด้วยยาปฏิชีวนะ ร่วมกับวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ โดยนำต้นรุ่น T₁ ที่มีชิ้นส่วนยีนมาเพาะเลี้ยง ปล่อยให้ผสมตัวเองได้เป็นรุ่น T₂ คัดเลือกโดยปลูกบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะอีกครั้ง โดยในรุ่น T₂ นั้น จะมีการกระจายของยีนที่ถ่ายเข้าไปออกเป็นสามแบบ คือ ต้นไม่มียีน ต้นที่มียีนแบบ homozygous และแบบ heterozygous ซึ่งต้นที่ไม่มียีนนั้นจะตายตอนปลูกบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ สำหรับต้นที่มียีนนำแต่ละต้นมาผสมตัวเองอีกครั้ง ได้เป็นรุ่น T₃ แล้วสุ่มเลือกต้นอะราบิโดบซิสจากแต่ละต้นของรุ่น T₂ มาอย่างน้อย 10 ต้น ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบยีน โดยถ้าเป็นรุ่น T₂ แบบ heterozygous จะได้ชิ้นส่วนของยีนไม่ครบทั้ง 10 ต้น แต่ถ้าเป็นรุ่น T₂ แบบ homozygous จะได้ชิ้นส่วนของยีนทุกต้นที่ตรวจสอบ และถือว่าต้นอะราบิโดบซิสดังกล่าวเป็นสายพันธุ์แท้

การถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว

ทำโดยเพาะเลี้ยงแคลลัสจาก scutellum ของเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อบนอาหาร MS ที่เติม casein hydrolysate 1g/L 2,4-D 2mg/L และวุ้นผง 1g/L เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ เมื่อเป็นแคลลัสแข็งแรงมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วจึงนำไปเพาะเลี้ยงร่วมกับ Agrobacterium ที่มีพลาสมิดที่ใช้ถ่ายยีน บนอาหารสูตรเดิมที่เติม Acetosyringone 100 μ M เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่มีการเติม hygromycin 50 mg/L และ cefotaxime 250 mg/L เพื่อคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนและฆ่าเชื้อ Agrobacterium ตามลำดับ เมื่อคัดเลือกแคลลัสที่สามารถเจริญบนอาหารที่มียา hygromycin ได้จึงย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเหนียวนำไปกระตุ้นแล้วเพาะเลี้ยงให้เป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์และทำการคัดเลือกต้นที่ได้การถ่ายยีนต่อไป

การตรวจสอบการสร้างไซโทกลูแคนในอะริบิตอบซิสที่ได้รับการถ่ายยีน

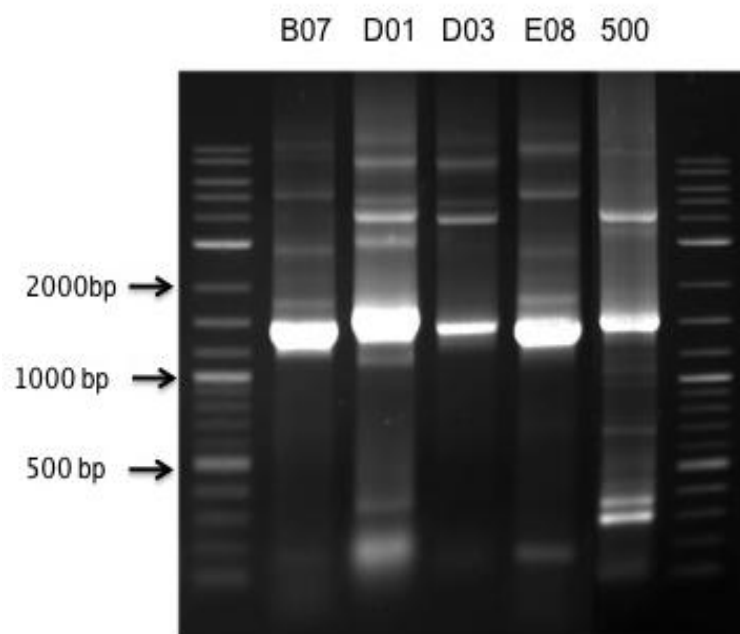
ตัดชิ้นเนื้อเยื่อตามขวางของก้านช่อดอกของอะริบิตอบซิสด้วยมีดโกนแล้วเก็บรักษาไว้ในสารละลาย 4% paraformaldehyde ใน 100 mM PIPES, pH 6.9 แล้วจึงทำการบล็อกเนื้อเยื่อด้วย 3% BSA ในสารละลาย 100 mM PIPES, pH 6.9 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงตรวจจับด้วยแอนติบอดี LM15 หรือ CCRC-M1 ในสารละลายเดียวกัน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วยสารละลาย 100 mM PIPES, pH 6.9 สามครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วจึงตรวจจับด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิ (antimouse หรือ antirabbit-FITC) ในสารละลาย 100 mM PIPES, pH 6.9 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย PIPE อีกสามครั้งแล้วตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซน

ผลและวิจารณ์

การโคลนยีน XXT ทั้ง 5 ยีน จากข้าว

จากยีนข้าวจำนวน 5 ยีน ที่ได้มีการทำนายจากลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI แล้วว่าน่าจะเป็นยีน xylosyltransferase (XXT) สามารถโคลนได้ครบแล้วทั้ง 5 ยีน โดยทำการโคลนจาก cDNA ที่ได้จากเนื้อเยื่อต่างๆของข้าว ด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นรหัสสำหรับการสร้างเอนไซม์ ผลของการพีซีอาร์ทั้ง 5 ยีนนั้นแสดงอยู่ในรูปที่ 1 เมื่อสามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้วจึงเชื่อมต่อเข้ากับกับเวกเตอร์ pGemTeasy แล้วทำการถ่ายฝากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเชื้อ *E. coli* และทำการตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยพีซีอาร์และเอนไซม์ตัดจำเพาะ ก่อนการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าทั้ง 5 ยีนที่ได้มีลำดับที่ถูกต้องตามฐานข้อมูลข้างต้น

รายชื่อและรายละเอียดขนาดของยีนทั้งจากอะริบิตอบซิสและข้าวที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้แสดงอยู่ในตารางที่ 1 โดยขนาดทั้งหมดของยีน (coding sequence) เป็นระยะของยีนตั้งแต่ start codon จนถึง stop codon ที่จะใช้ในการถ่ายฝากจาก ข้าวเข้าสู่อะริบิตอบซิส และอะริบิตอบซิสเข้าสู่ข้าว ส่วน coding sequence for protein expression เป็นส่วนของยีนที่จะใช้ในการเชื่อมต่อเข้ากับ purification tag และถ่ายเข้าสู่ *E. coli* เพื่อใช้ในการผลิตโปรตีนสำหรับการทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยลำดับเบสที่จะใช้นี้เป็นการตัดเอาชิ้นส่วนด้านหน้าปลาย 5' ของยีนประมาณ 70-150 นิวคลีโอไทด์ ที่ทำหน้าที่เป็น signal peptide ในพืช แต่จะเป็นส่วนที่ขัดขวางการผลิตโปรตีนใน *E. coli*



ภาพที่ 1 การโคลนยีน *XXT* จากข้าวทั้ง 5 ยีนตรวจสอบโดยอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตารางที่ 1 ยีน Xyloglucan xylosyltransferase (*XXT*) ของอะราบิดอบซิสและข้าวที่ใช้ในการศึกษา

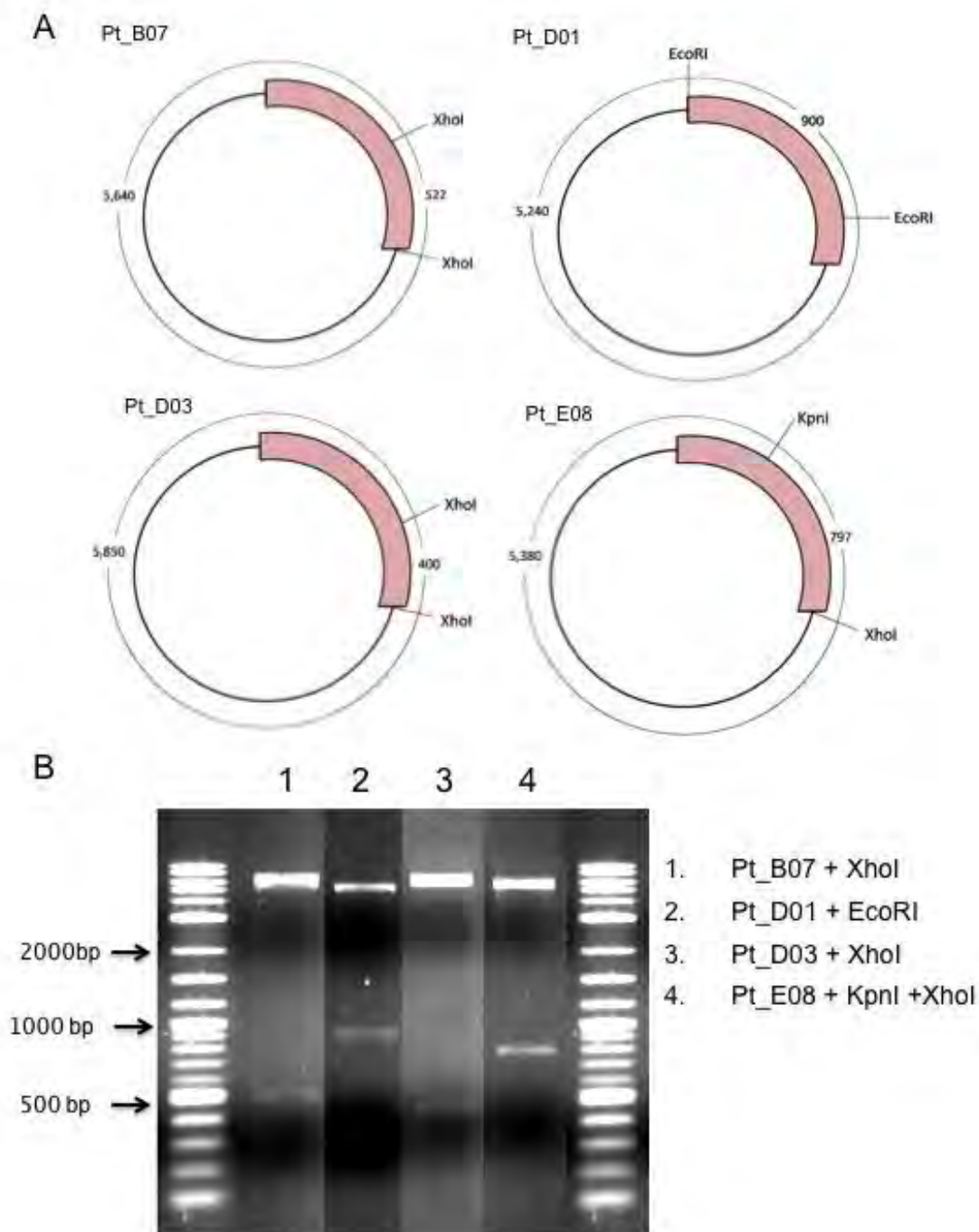
Gene locus	Gene name	Coding sequence (base pair)	Coding sequence for protein expression (base pair)
At1g18690	<i>AtXXT4</i>	1542	-
At1g74380	<i>AtXXT5</i>	1374	-
At3g62720	<i>AtXXT1</i>	1383	-
At4g02500	<i>AtXXT2</i>	1386	-
At5g07720	<i>AtXXT3</i>	1374	-
Os02g0529600	<i>D01</i>	1443	1240
Os02g0723200	<i>E08</i>	1344	1277
Os12g0149300	<i>B07</i>	1392	1262
Os03g0305800	<i>D03</i>	1452	1351
Os11g0546500	<i>500</i>	1452	1269

การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *E. coli* และทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์

เวกเตอร์สำหรับการผลิตโปรตีนในการทดลองนี้ใช้ pGEX system (Amersham) ที่มี N-terminal GST-fusion tag เพื่อช่วยในการทำให้โปรตีนให้บริสุทธิ์ หลังจากทำการเชื่อมต่อยีนข้าวทั้ง 4 ยีน คือ B07 D01 D03 และ E08 เข้าสู่เวกเตอร์ pGEX โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะและเอนไซม์ ligase แล้ว จึงทำการโคลนเข้าสู่ *E. coli* ทำการคัดเลือกโคลนและตรวจสอบความถูกต้องของโคลนได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและตรวจสอบลำดับเบส ภาพที่ 2 แสดงแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะของพลาสมิดทั้ง 4 ที่สร้างได้ และผลจากการตัดของเอนไซม์เพื่อแสดงถึงความถูกต้องของพลาสมิดที่คัดเลือกมา

เมื่อได้พลาสมิดที่ถูกต้องแล้วจึงทำการถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ซึ่งเป็นสายพันธุ์สำหรับการผลิตโปรตีน เมื่อได้ *E. coli* BL21 ที่มีพลาสมิดแล้วจึงทำการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตโปรตีนและทำการสกัดโดยใช้วิธี osmotic pressure ร่วมกับการใช้ lysozyme แล้วทำการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ Sepharose 4B bead ที่จับกับ GST tag ที่ติดอยู่บนโปรตีน ภาพที่ 3 แสดงถึงรีคอมบิแนนท์โปรตีน B07 D01 D03 และ E08 บริสุทธิ์ที่สกัดได้ตามลำดับ โดยรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ต่อกับ GST ทั้ง 4 มีขนาดประมาณ 72 kDa

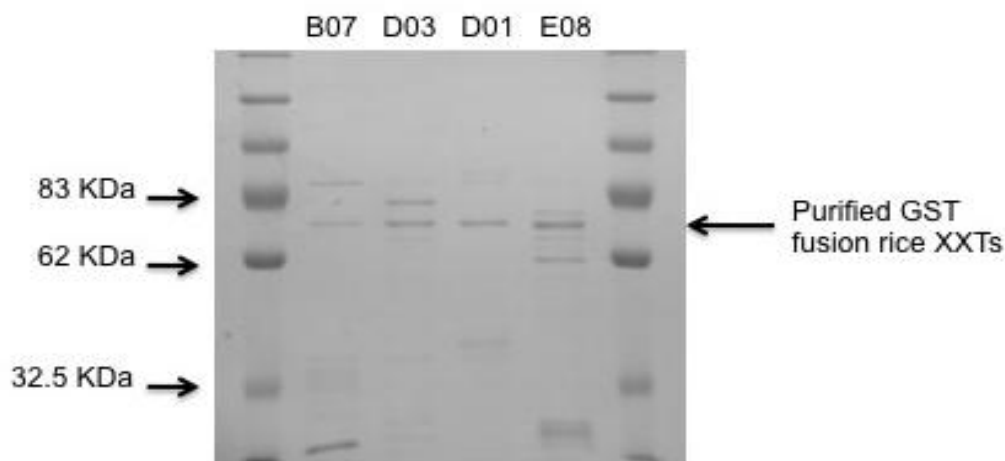
การทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ *XXT* นี้ทำโดยการบ่มเอนไซม์ร่วมกับสารตั้งต้น UDP-[c^{14}]Xyl และตัวรับคือ cellohexaose แล้วตรวจสอบการเติมน้ำตาล xylose ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี บนโมเลกุล cellohexaose ด้วย TLC และ autoradiography จากการตรวจสอบนั้นพบว่าเอนไซม์ทั้ง 4 ตัว ไม่สามารถเติมน้ำตาล xylose เข้าสู่ cellohexaose ได้เลย ซึ่งต่างจากเอนไซม์ *XXT* ที่ผลิตจากยีนของ *Arabidopsis* ซึ่ง 3 จาก 5 เอนไซม์ (*XXT1*, *XXT2* และ *XXT4*) สามารถเร่งปฏิกิริยาการเติมน้ำตาลไซโลสได้ อย่างไรก็ตามการที่เอนไซม์จากข้าวไม่สามารถเร่งปฏิกิริยานี้ได้มิได้หมายความว่าเอนไซม์ของข้าวไม่ได้ทำหน้าที่เป็น *XXT* ตามที่คาดหมายเนื่องจาก *XXT* จากอะราบิโกบซิส (*XXT3* และ *XXT5*) ที่ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยานี้ในการทดสอบปฏิกิริยาด้วยกัมมันตรังสีเช่นเดียวกัน แต่สามารถสร้างไซโลกลูแคนได้เมื่อถ่ายยีนเข้าสู่พืช (Vuttipongchaikij et al., 2012) ดังนั้นจึงต้องตรวจสอบหน้าที่ของเอนไซม์ของข้าวนี้ต่อไปด้วยการทดสอบถ่ายยีนเข้าสู่พืช



ภาพที่ 2 การสร้างพลาสมิดสำหรับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *E. coli*

A. แผนที่การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับการตรวจสอบโคลนของยีน B07 D01 D03 และ E08 ตามลำดับ ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงไว้มีหน่วยเป็นคู่เบส

B. ผลของการตรวจสอบโคลนจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของแต่ละยีนโดยวิธี agarose gel electrophoresis



ภาพที่ 3 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์คอมบิแนนท์โปรตีนและการทำให้บริสุทธิ์ของยีนข้าว 4 ยีนจาก *E. coli* โดยวิธี SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie blue staining

การสร้างพลาสมิดสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่อะราบิโดบซิส

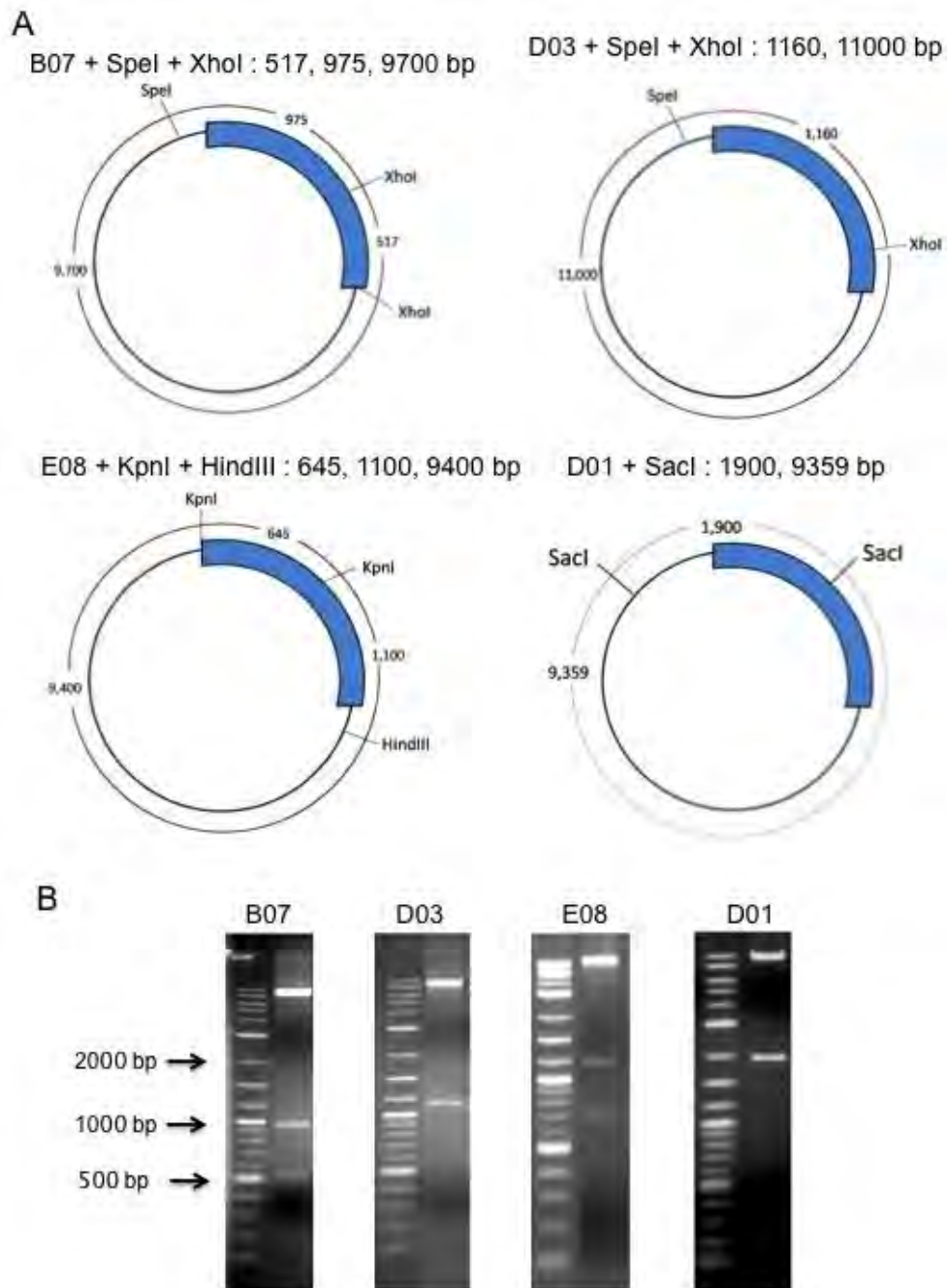
เวกเตอร์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ pH2GW7 การสร้างพลาสมิดทำโดยนำพลาสมิดของยีนข้าวที่โคลนได้ ข้างต้นมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วจึงทำการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pENTR เพื่อทำการสร้างพลาสมิดด้วยวิธี Gateway cloning เมื่อต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับ pENTR แล้วจึงนำมาตรวจสอบทิศทางก่อนที่จะทำการผสมพลาสมิดนี้กับพลาสมิด pH2GW7 และทำการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ Clonase II โดยพลาสมิดสุดท้ายที่ได้จะประกอบด้วย โปรโมเตอร์ 35S ต่อด้วยยีนที่โคลนได้และตามด้วยเทอร์มินเตอร์ โดยทั้งหมดนี้อยู่ในส่วนของ left border และ right border ของ T-DNA และมี hygromycin resistance gene สำหรับการคัดเลือกพลาสมิดที่ได้จะนำไปถ่ายเข้าสู่ *Agrobacterium* โดยวิธีจุ่มดอกลงในสารแขวนลอย *Agrobacterium* ที่มีพลาสมิดที่ใช้ถ่ายยีนอยู่ ภาพที่ 4 แสดงถึงแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะของพลาสมิด pH2GW ที่ต่อกับยีน B07 D01 D03 และ E08 และผลจากการตัดด้วยเอนไซม์ยืนยันความถูกต้องของพลาสมิดที่สร้างได้

ภาพที่ 4 ยืนยันถึงความถูกต้องของโคลนที่เลือกได้โดยการตรวจสอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งได้ผลตรงกับแผนที่การตัดด้วยเอนไซม์จากการวางแผนสร้างพลาสมิด ยีน 500 ที่ไม่ได้แสดงแผนที่การตัดมานั้นได้ทำการตรวจสอบโดยการหาลำดับเบสและพบว่าพลาสมิดที่สร้างขึ้นนั้นถูกต้อง ดังนั้นจากยีนของข้าวที่โคลนได้ มีทั้งหมด 5 ยีน ขณะนี้สร้างพลาสมิดที่ใช้ถ่ายยีนได้แล้วทั้งหมด โดยขั้นตอนสุดท้ายได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องโดยการตรวจสอบลำดับเบส

โดยสรุปพลาสมิดที่พร้อมใช้ในการถ่ายยีนมีจำนวนดังนี้

5 พลาสมิดจากยีนของข้าว

5 พลาสมิดจากยีนของอะราบิโดบซิส



ภาพที่ 4.. การสร้างพลาสมิดสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่อะราบิโดบซิส

แผนที่การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับการตรวจสอบโคลนของยีน B07 D01 D03 และ E08 ที่ต่ออยู่ในพลาสมิด pH2GW7 ตามลำดับ ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงไว้มีหน่วยเป็นคู่เบส ผลของการตรวจสอบโคลนจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของแต่ละยีนโดยวิธี agarose gel electrophoresis

การถ่ายยีน *XXT* จากข้าวเข้าสู่อะราบิดอบซิส

การถ่ายยีนเข้าสู่อะราบิดอบซิสใช้วิธี *floral dipping* โดยการใช้ต้นอะราบิดอบซิสที่กำลังออกดอกจุ่มลงไปในสารแขวนลอยที่มีเซลล์อะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิดสำหรับการถ่ายยีนอยู่ แล้วจึงทำการเก็บเมล็ดเพื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มียาปฏิชีวนะสำหรับการคัดเลือก ขณะนี้ได้ทำการถ่ายยีนไปแล้วทั้งหมด 4 ยีนตามจำนวนพลาสมิดที่สร้างขึ้นได้ และคัดเลือกต้นที่ได้รับยีน และคัดเลือกต้นที่เป็น *homozygous* สำหรับยีนที่ถ่ายเข้าไป ซึ่งเป็นการคัดเลือกผ่านพืชผสมตัวเองจำนวน 2 รุ่น

ภาพที่ 5 แสดงถึงผลของการถ่ายยีนและการคัดเลือกอะราบิดอบซิสสายพันธุ์ที่ได้รับยีน โดยอะราบิดอบซิสที่คัดเลือกได้นั้นเป็นสายพันธุ์กลายที่มียีน *XXT2* *XXT4* *XXT5* ถูกทำลายไปพร้อมกันภายในต้นเดียวกัน และมียีน *B07* *D03* และ *E08* ที่ถ่ายฝากเข้าไป ส่วนยีน *D01* นั้นกำลังทำการคัดเลือกต้นที่ได้รับยีน และกำลังถ่ายยีน 500 เข้าสู่อะราบิดอบซิสสายพันธุ์กลายนี้ด้วย

นอกจากนี้งานที่ได้ดำเนินงานสำเร็จแล้ว คือการสร้างอะราบิดอบซิสสายพันธุ์ที่มียีนถูกทำลายพร้อมกัน 4 ยีน คือ *XXT1* *XXT2* *XXT4* *XXT5* (ภาพที่ 6) โดยการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์กลายที่มียีน *XXT* ที่เสียไปกับและคัดเลือกต้นที่เป็น *homozygous line* ทั้ง 4 ตำแหน่ง เพื่อใช้เป็นต้นเริ่มสำหรับการถ่ายยีนทั้ง 5 ยีน และในการศึกษาผลของการทำลายยีนสังเคราะห์ไซโทกลูแคนต่อพืชต่อไป

การถ่ายยีน *XXT* จากอะราบิดอบซิสเข้าสู่ข้าว

การถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวจะต้องทำผ่านแคลลัส โดยทำการเลี้ยงเมล็ดข้าวในระบบปลอดเชื้อเพื่อชักนำเป็นแคลลัส แล้วจึงนำไปเลี้ยงกับอะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิดสำหรับถ่ายยีน จากนั้นทำการฆ่าเชื้ออะโกรแบคทีเรียด้วยยาปฏิชีวนะและคัดเลือกแคลลัสที่ได้การถ่ายยีนด้วยยาปฏิชีวนะและชักนำให้เป็นต้น เนื่องจากมหาวิทยาลัยประสบภาวะน้ำท่วมที่ผ่านมา หม้อแปลงไฟตึกน้ำท่วมจึงทำให้มีความจำเป็นต้องตัดไฟทำให้แคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนแล้วและอยู่ในขั้นตอนการชักนำให้เป็นต้น แห้งตายทั้งหมด จึงทำให้การทดลองนี้ไม่สามารถทำตามแผนที่วางไว้ได้

ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ปรับแผนโดยการถ่ายยีนจากอะราบิดอบซิสเข้าสู่ยาสูบแทน โดยไซโทกลูแคนของยาสูบนั้นพบว่ามีการสร้างที่คล้ายกับที่พบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจึงคาดว่าน่าจะนำมาใช้ศึกษาแทนข้าวได้ ในขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างการถ่ายยีนเข้าสู่ยาสูบ

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ข้าวที่ถ่ายเข้าสู่อะราบิดอบซิส

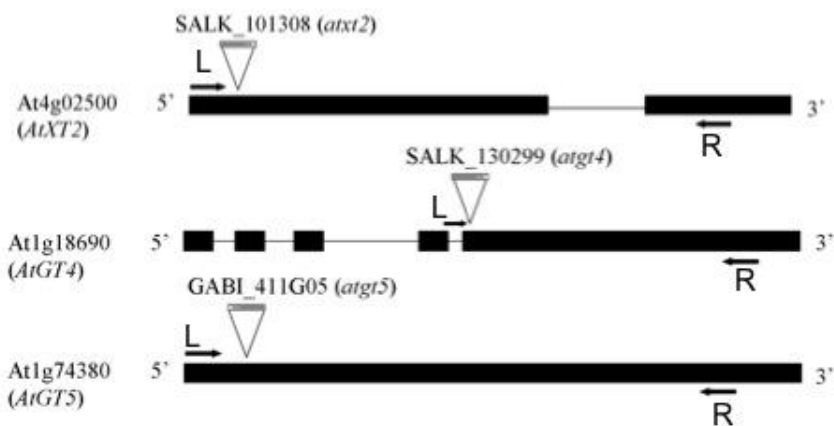
ตรวจสอบการแสดงออกของยีนข้าวในอะราบิดอบซิสพันธุ์กลาย 2 สายพันธุ์ คือ *xxt1* *xxt2* และ *xxt2 4 5* โดยการสกัดอาร์เอ็นเอและสร้าง cDNA ก่อนการทำ RT-PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ถ่ายเข้าไป ภาพที่ 7 แสดงแถบดีเอ็นเอสำหรับการแสดงออกของยีน *B07*, *D03* และ *E08* ในอะราบิดอบซิสพันธุ์กลายที่ได้รับยีน โดยตัวควบคุมคือ อะราบิดอบซิสสายพันธุ์ควบคุม (*wild type*) และสายพันธุ์กลายที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน พบว่าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แสดงให้เห็นว่ายีนที่ถ่ายเข้าไปในอะราบิดอบซิสสายพันธุ์กลายมีการแสดงออกจริง

การตรวจสอบการสังเคราะห์ไซโทกลูแคนในอะราบิโดบซิสสายพันธุ์กลายที่ได้รับการถ่ายยีนโดยวิธี immunolabelling

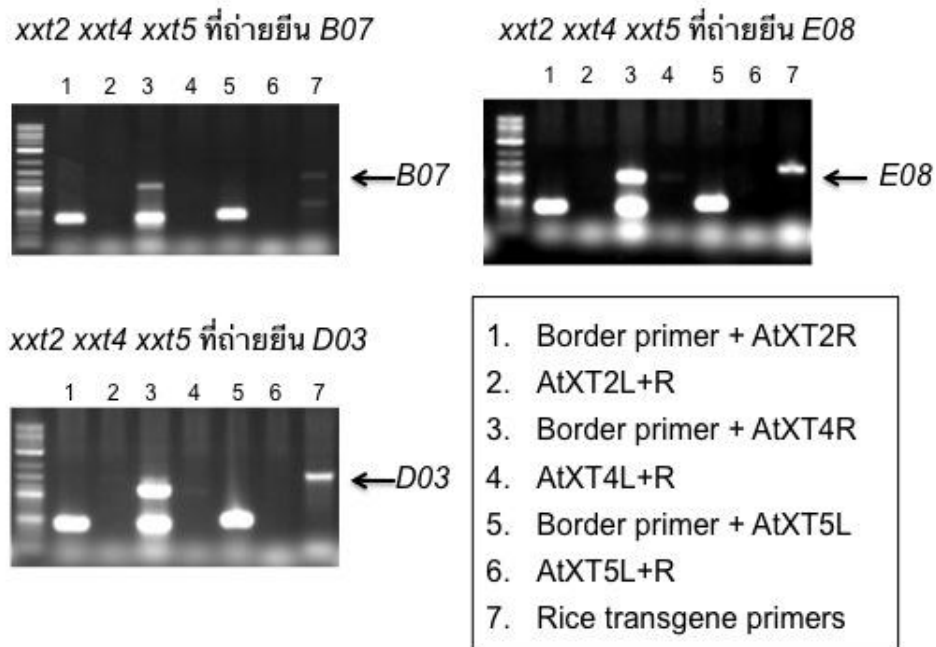
เพื่อตรวจสอบว่าอะราบิโดบซิสสายพันธุ์กลายที่มียีนข้าวแสดงออกอยู่นั้นสามารถผลิตไซโทกลูแคนได้หรือไม่ จึงทำการตัดชิ้นเนื้อเยื่อของก้านช่อดอกแบบตามขวางแล้วตรวจจับด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะกับไซโทกลูแคน 2 ชนิด คือ LM15 ซึ่งจำเพาะกับแกนกลางของโครงสร้างไซโทกลูแคน และ CCRC-M1 ที่จำเพาะกับกิ่งของไซโทกลูแคนที่เป็นน้ำตาลฟูโคส และตรวจสัญญาณด้วยการเรืองแสงของ FITC (Green fluorescence signal) จากการตรวจสอบสายพันธุ์กลายชนิด *xxt1 xxt2* ที่ได้รับการถ่ายยีนข้าวพบว่ายีนจากข้าวทั้ง 3 ยีนไม่สามารถสร้างไซโทกลูแคนได้ในอะราบิโดบซิสสายพันธุ์กลายชนิดนี้ (ภาพที่ 8) โดยปกติ wild type จะสามารถตรวจสอบผลได้บริเวณของเนื้อเยื่อโฟลเอ็มและไซเลม ส่วนสายพันธุ์กลาย *xxt1 xxt2* จะตรวจไม่พบทั้ง 2 บริเวณ และเมื่อตรวจสอบสายพันธุ์กลายที่ได้รับการถ่ายยีนก็ไม่พบการเพิ่มขึ้นของสัญญาณสำหรับไซโทกลูแคนจากแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิด

เมื่อตรวจสอบการสายพันธุ์กลายชนิด *xxt2 4 5* ที่ได้รับการถ่ายยีนพบว่า จากปกติสายพันธุ์กลายที่ตรวจพบไซโทกลูแคนได้เล็กน้อยที่บริเวณโฟลเอ็มด้วยแอนติบอดีชนิด LM15 เมื่อถ่ายยีนข้าวแล้วสามารถสร้างไซโทกลูแคนได้เพิ่มขึ้นทั้งในบริเวณโฟลเอ็มและไซเลม อย่างไรก็ตามแอนติบอดี CCRC-M1 กลับตรวจไม่พบการเพิ่มขึ้นของไซโทกลูแคน ทั้งนี้เนื่องมาจาก CCRC-M1 จำเพาะกับส่วนที่เป็นกิ่งข้างของโมเลกุลไซโทกลูแคน ส่วน LM15 จำเพาะกับโครงสร้างหลักที่เป็นแกนกลาง ดังนั้นการตรวจตรวจสอบพบเฉพาะแอนติบอดี LM15 แสดงว่าการสังเคราะห์ไซโทกลูแคนด้วยยีนจากข้าวนั้นมีโครงสร้างไม่เหมือนการสังเคราะห์จากยีนของอะราบิโดบซิส อย่างไรก็ตามการพิสูจน์โครงสร้างต้องมีการวิเคราะห์เพิ่มเติมโดยใช้เทคนิคทาง HPLC และ mass spectrometry ต่อไป

A

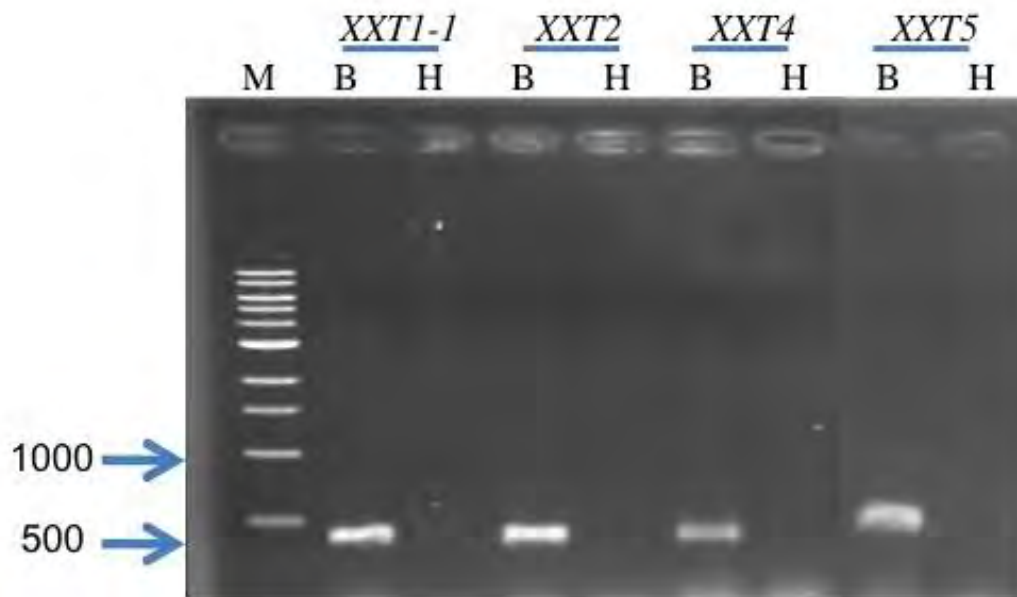


B

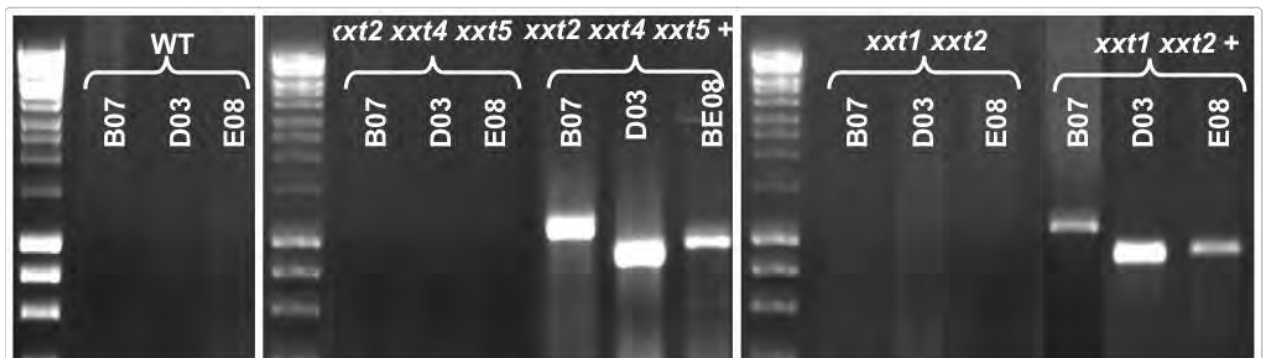


ภาพที่ 5 การยืนยันการคัดเลือกต้นอะราบิดอปซิสสายพันธุ์กลายที่ได้รับยีน

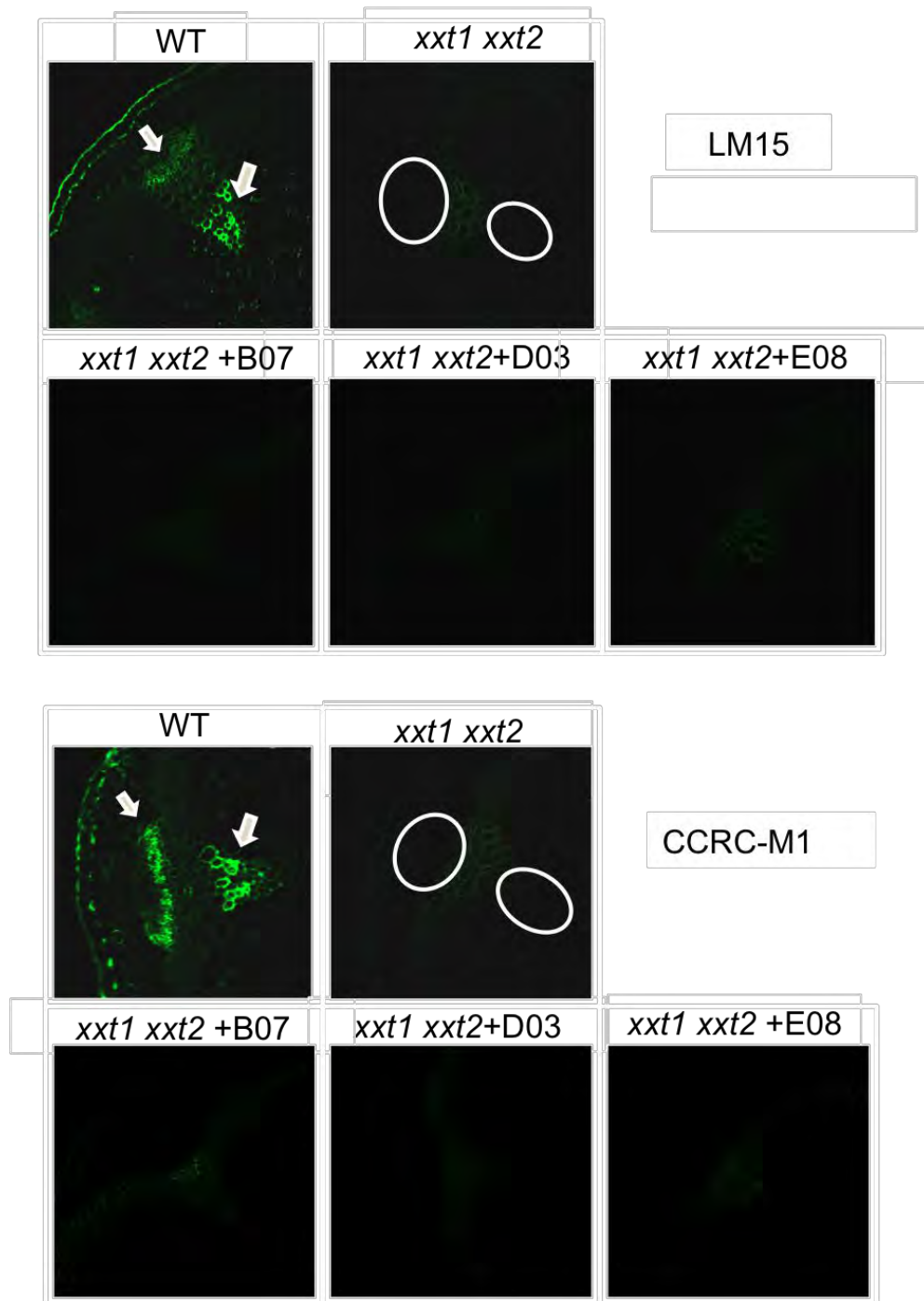
แผนภาพตำแหน่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบยีนที่ถูกทำลายด้วย T-DNA insertion ของยีน *XXT2*, *XXT4* และ *XXT5* ตามลำดับ โดยไพรเมอร์ L และ R ใช้ในการตรวจสอบ homozygosity ของอะราบิดอปซิสที่ได้ ส่วนการจับคู่ไพรเมอร์กับ border primer เพื่อยืนยันตำแหน่งการแทรกของชิ้น T-DNA ที่ตำแหน่งนั้นจริง ผลของการพีซีอาร์ของต้นอะราบิดอปซิสสายพันธุ์กลายที่ได้รับยีน *B07*, *E08* และ *D03* ที่คัดเลือกได้ตามลำดับ โดยผลในช่องที่ 1-2, 3-4 และ 5-6 ยืนยันความเป็น homozygosity ของยีน *XXT2*, *XXT4* และ *XXT5* ตามลำดับและ ช่องที่ 7 บ่งชี้ถึงยีนข้าวที่ได้ถ่ายเข้าสู่อะราบิดอปซิส



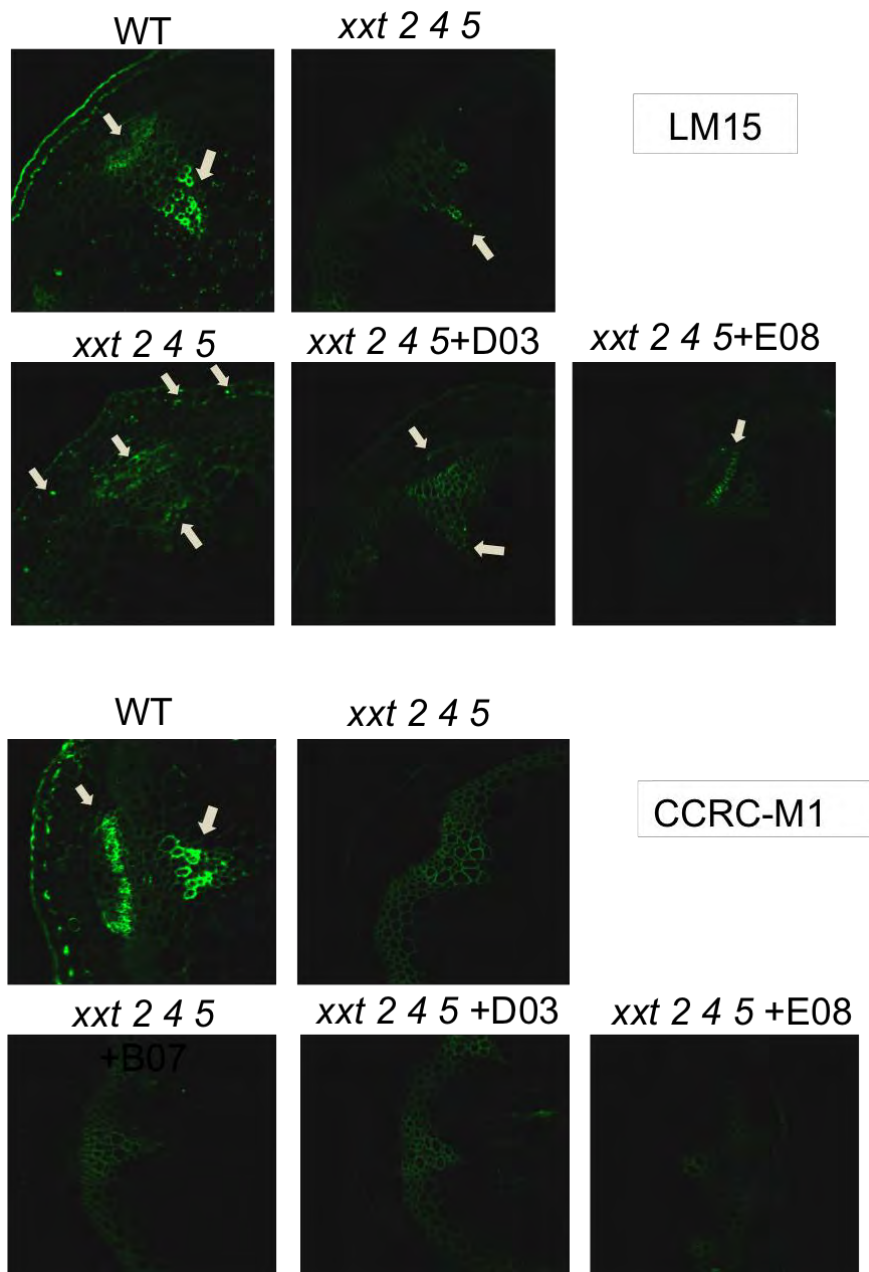
ภาพที่ 6 ผลของการพีซีอาร์ของต้นอะราบิดอปซิสสายพันธุ์กลายของยีน *XXT1*, *2*, *4* และ *5* พร้อมกัน ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์กลายของแต่ละยีน ผลของแถบดีเอ็นเอจากการพีซีอาร์ในช่อง B ยืนยันถึงตำแหน่งของ T-DNA ในยีนนั้นๆ ในจีโนมของอะราบิดอปซิส ส่วนการไม่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏในช่อง H แสดงความเป็น homozygosity ของยีน *XXT1-1*, *XXT2*, *XXT4* และ *XXT5* ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากการแทรกชิ้นส่วนของ T-DNA ในยีนจะเป็นการยับยั้งการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในยีนนั้นๆ ได้



ภาพที่ 7 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนข้าว *B07* *D03* และ *E08* ในอะราบิดอปซิสสายพันธุ์กลาย ด้วยวิธี RT-PCR การทดสอบ RT-PCR ของ WT, สายพันธุ์กลาย *xxt2 xxt4 xxt5* และสายพันธุ์กลาย *xxt1 xxt2* เป็นตัวควบคุม และการทดสอบของ *xxt2 xxt4 xxt5* + และ *xxt1 xxt2* + แสดงถึงการแสดงออกของยีนที่ถ่ายเข้าไป



ภาพที่ 8 การตรวจสอบไซโลกลูแคนด้วยวิธี immunolabelling ด้วยแอนติบอดี LM15 และ CCRC-M1 การตรวจสอบใน wild type แสดงการตรวจจับไซโลกลูแคนในอะราบิโดบซิสปกติ ส่วนการตรวจสอบ ในสายพันธุ์กลาย *xxt1 xxt2* แสดงการขาดหายไปของไซโลกลูแคน สัญญาณที่ตรวจพบบริเวณของ secondary xylem เป็น auto-fluorescence จาก phenolic compound ในเนื้อเยื่อ



ภาพที่ 9 การตรวจสอบไซโลกลูแคนด้วยวิธี immunolabelling ด้วยแอนติบอดี LM15 และ CCRC-M1 การตรวจสอบใน wild type แสดงการตรวจจับไซโลกลูแคนในอะราบิโดบซิสปกติ ส่วนการตรวจสอบใน สายพันธุ์กลาย *xxt2 xxt4 xxt5* แสดงการขาดหายไปของไซโลกลูแคน สัญญาณที่ตรวจพบบริเวณของ secondary xylem เป็น auto-fluorescence จาก phenolic compound ในเนื้อเยื่อ

สรุปและเสนอแนะ

ได้โคลนยีน *XXT* จากข้าวทั้ง 5 ยีนที่มีความถูกต้องจากการตรวจสอบลำดับเบส และสร้างพลาสมิดสำหรับถ่ายยีนข้าวนี้แล้ว 5 พลาสมิด ได้ทำการถ่ายยีนเข้าสู่อะราบิโดพซิสและสามารถคัดเลือกต้นที่ได้รับยีนแล้วจากทั้ง 5 ยีน ในขณะนี้กำลังทำการคัดเลือกอะราบิโดพซิสที่มียีนที่ถ่ายเข้าไปในสภาพ homozygous จากการผสมตัวเอง และคัดเลือกด้วยพีซีอาร์ ผลจาก RT-PCR ยืนยันได้ว่ายีนที่ถ่ายเข้าไปมีการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอจริง ส่วนการถ่ายยีนจากอะราบิโดพซิสเข้าสู่ข้าวนี้มีอุปสรรคเนื่องจากจากการชักนำแคลลัสที่ได้รับยีนให้เป็นต้นนั้นมีอัตราส่วนที่ต่ำและผลจากน้ำท่วมที่ผ่านมาทำให้แคลลัสที่ถ่ายยีนแล้วแห้งตาย ทำให้การทดลองนี้ทำได้ไม่สำเร็จ เพื่อได้ข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับหน้าที่ของเอนไซม์ *XXT* ของข้าวผู้วิจัยได้ทำการผลิตโปรตีนชนิดนี้ใน *E. coli* และทำการแยกให้บริสุทธิ์ก่อนทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ ถึงแม้ว่าจะสามารถแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์และมีปริมาณเพียงพอต่อการศึกษา แต่ก็ตรวจไม่พบปฏิกิริยาของเอนไซม์นี้ ดังที่สามารถตรวจได้จากเอนไซม์ *XXT* ของอะราบิโดพซิส ทำให้ยังไม่สามารถให้ข้อมูลเพิ่มเติมของเอนไซม์กลุ่มนี้ได้ เมื่อตรวจสอบการสังเคราะห์ไซโลกลูแคนโดยยีนที่ถ่ายเข้าไปในต้นอะราบิโดพซิสพันธุ์กลายพบว่ายีนทั้ง 3 สามารถสร้างไซโลกลูแคนได้ในสายพันธุ์กลายชนิด *txt2 4 5* แต่ไม่สามารถสังเคราะห์ได้ในสายพันธุ์ *txt1 txt2* โดยตรวจสอบพบเฉพาะโมเลกุลแกนหลัก (backbone) แต่ตรวจไม่พบกิ่งด้านข้างของน้ำตาลฟูโคส ทั้งนี้เป็นการแสดงในขั้นต้นว่ายีนทั้ง 3 เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไซโลกลูแคนและสามารถสังเคราะห์ได้ในต้นอะราบิโดพซิส การทดลองต่อไปจะเป็นการรวบรวมอะราบิโดพซิสที่ได้รับการถ่ายยีนที่เป็นสายพันธุ์แท้ (homozygous) ก่อนทำการวิเคราะห์การสังเคราะห์ไซโลกลูแคนและผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของต้นอะราบิโดพซิสต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Atichokudomchai, N., Jane, J.L., and Hazlewood, G. (2006). Reaction pattern of a novel thermostable α -amylase. *Carbohydrate polymers* 64: 582-588.
2. Cosgrove, D.J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 850-861.
3. Carpita, N.C., and Gibeaut, D.M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* 3, 1-30.
4. Cavalier, D.M., and Keegstra, K. (2006). Two xyloglucan xylosyltransferases catalyze the addition of multiple xylosyl residues to cellohexaose. *J Biol Chem* 281, 34197-34207.
5. Cocuron, J.C., Lerouxel, O., Drakakaki, G., Alonso, A.P., Liepman, A.H., Keegstra, K., Raikhel, N., and Wilkerson, C.G. (2007). A gene from the cellulose synthase-like C family encodes a beta-1,4 glucan synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8550-8555.
6. Cosgrove D.J., Li Z.-C. (1993) .Role of expansin in cell enlargement of oat coleoptiles: analysis of developmental gradients and photocontrol. *Plant Physiol* 103: 1321-1328.
7. Faik, A., Bar-Peled, M., DeRocher, A.E., Zeng, W., Perrin, R.M., Wilkerson, C., Raikhel, N.V., Keegstra, K. (2000). Biochemical characterization and molecular cloning of an alpha-1,2-fucosyltransferase that catalyzes the last step of cell wall xyloglucan biosynthesis in pea. *J Biol Chem* 275, 15082.
8. Fry, S.C., Smith, R.C., Renwick, K.F., Martin, D.J., Hodge, S.K., and Matthews, K.J. (1992). Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem J* 282 (Pt 3), 821-828.
9. Hayashi, T. (1989). Xyloglucans in the primary cell wall. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40, 139-168.
10. Madson, M., Dunand, C., Li, X., Verma, R., Vanzin, G.F., Caplan, J., Shoue, D.A., Carpita, N.C., and Reiter, W.D. (2003). The MUR3 gene of Arabidopsis encodes a xyloglucan galactosyltransferase that is evolutionarily related to animal exostosins. *Plant Cell* 15, 1662-1670
11. McCann, M.C., Wells, B., and Roberts, K. (1990). Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *J Cell Sci* 96, 323-334.
12. McQueen-Mason, S., Durachko, D.M., and Cosgrove, D.J. (1992). Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* 4, 1425-1433.
13. Pauly, M., Albersheim, P., Darvill, A., and York, W.S. (1999). Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *Plant J* 20, 629-63

14. Popper, Z.A., and Fry, S.C. (2003). Primary cell wall composition of bryophytes and charophytes. *Ann. Bot. (Lond.)* 91: 1–12.
15. Robyt, J.F. and Mukerjee, R. (1994). Separation and quantitative determination of nanogram quantities of maltodextrins and isomaltodextrins by thin layer chromatography, *Carbohydrate Research* 251: 187–202.
16. Rose, J.K.C., and Bennett, A.B. (1999) Cooperative disassembly of the cellulose–xyloglucan network of plant cell walls: Parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends Plant Sci.* 4: 176-183.
17. Vanzin, G.F., Madson, M., Carpita, N.C., Raikhel, N.V., Keegstra, K., and Reiter, W.D. (2002). The mur2 mutant of *Arabidopsis thaliana* lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase AtFUT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3340-3345.
18. Vincken, J.P., York, W.S., Beldman, G., and Voragen, A.G. (1997). Two general branching patterns of xyloglucan, XXXG and XXGG. *Plant Physiol.* 114: 9–13
19. Yokoyama, R., Rose, J.K., and Nishitani, K. (2004). A surprising diversity and abundance of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases in rice. Classification and expression analysis. *Plant Physiol* 134, 1088-1099..

Output ที่ได้จากโครงการ Acknowledge the Thailand Research Fund: MRG5480289

Vuttipongchaikij, S., Brocklehurst, D., Steele-King, C., Ashford, D.A., Gomez, L.D., McQueen-Mason, S.J. 2012. Arabidopsis GT34 family contains five xyloglucan α -1,6-xylosyltransferases. New Phytologist. Vol. 195 (3): 585-595.

ภาคผนวก

บทความสำหรับการเผยแพร่

Vuttipongchaikij, S., Brocklehurst, D., Steele-King, C., Ashford, D.A., Gomez, L.D., McQueen-Mason, S.J. 2012. Arabidopsis GT34 family contains five xyloglucan α -1,6-xylosyltransferases. New Phytologist. Vol. 195 (3): 585-595.

Arabidopsis GT34 family contains five xyloglucan α -1,6-xylosyltransferases

Supachai Vuttipongchaikij^{1,2}, David Brocklehurst³, Clare Steele-King³, David A. Ashford³, Leonardo D. Gomez³ and Simon J. McQueen-Mason³

¹Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, 50 Ngam Wong Wan Road, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand; ²Center for Advanced Studies in Tropical Natural Resources, Kasetsart University, Ngam Wong Wan, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand; ³CNAP, Biology Department, University of York, Heslington, York YO10 5DD, UK

Summary

Author for correspondence:

Simon McQueen-Mason

Tel: +44 1904328775

Email: simon.mcqueenmason@york.ac.uk

Received: 22 April 2012

Accepted: 23 April 2012

New Phytologist (2012) 195: 585–595

doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04196.x

Key words: *Arabidopsis*, cell wall biosynthesis, galactomannan, glycosyltransferase, plant cell walls, xyloglucan.

- The *Arabidopsis* genome includes seven family 34 glycosyltransferase (GT34) encoding genes. *XXT1* and *XXT2* have previously been shown to encode XyG α -1,6-xylosyltransferases, while knockout mutants of a third, *XXT5*, exhibit decreased XyG content, suggesting a similar activity. Here, we extend the study to the rest of the *Arabidopsis* GT34 genes in terms of biochemical activity and their roles in XyG biosynthesis.
- The enzyme activity of XXTs was investigated using recombinant protein expressed in *E. coli*. XyG analysis of single and double T-DNA insertion knockouts, together with overexpression of GT34s in selected mutant lines, provided detailed function of each gene.
- We reveal the activity of the third member of the GT34 gene family (*XXT4*) that exhibits xylosyltransferase activity. Double mutants for either *xxt2* or *xxt5* had a large impact on XyG content, structure and size distribution. Overexpression of the remaining member, *XXT3*, was able to restore XyG epitopes in *xxt2*, *xxt5* and *xxt2 xxt5* double knockouts, suggesting that it also encodes a protein with XXT activity.
- Our work demonstrates that five of the seven *Arabidopsis* GT34 genes encode XXT enzymes.

Introduction

Xyloglucans comprise the major hemicellulose polymers in the primary walls of most angiosperms with the exception of the grasses, where they are less abundant (Carpita & Gibeau, 1993). Various observations in the past have led to the hypothesis that XyGs play a key role in growing plant cell walls by providing major crosslinking tethers between neighbouring cellulose microfibrils (Albersheim *et al.*, 2010; Fry, 1989; Hayashi, 1989; Cosgrove, 1999). This model has recently been challenged by Cavalier *et al.* (2008), who suggested that the double insertion knockout plants lacking XyGs could grow fairly normally and the role of XyGs in plant growth and development is more subtle than previously thought. In support of this, Dick-Pérez *et al.* (2011) demonstrated that cellulose-XyG crosslinks do not occur as much as previously expected, and analysis of triple knockout mutants suggested that the load-bearing function of the plant cell wall relies on a single network of cellulose, hemicelluloses and pectin rather than a cellulose-XyG network, and that the lack of XyGs in the cell walls caused weakening of this network. Nevertheless, follow-up work by Park & Cosgrove (2012) demonstrated that, although not essential for survival, XyGs are indeed important for wall loosening by α -expansin or through acid-induced growth, in association with xylan and pectin polymers in the walls. Together with a number of enzymes that have

been shown to modulate cell wall extensibility and thereby cell expansion by modifying XyG molecules (including expansins, McQueen-Mason *et al.*, 1992; XyG endo-transglucosylases/hydrolases, Fry *et al.*, 1992; and endo-glucanases, Park *et al.*, 2003), this supports a biological role for XyGs in cell wall extension.

XyGs are complex polysaccharides comprising a β -1,4-D-glucan backbone decorated with α -1,6-xylose (Xyl) side chains. In most dicots, including *Arabidopsis*, these xylose side chains typically occur on contiguous blocks of three glucose residues separated by an unsubstituted glucose. Generally, seed storage XyGs are not further substituted, whereas those from growing plant cell walls are typically substituted with β -1,2-D-galactose linked to the second or third Xyl residues, and these galactosyl residues may be further substituted with α -1,2-L-fucose (Zabackis *et al.*, 1995).

In *Arabidopsis* the characterization of XyG fucosyl and galactosyltransferases has been the subject of extensive study (Perrin *et al.*, 1999; Vanzin *et al.*, 2002; Madson *et al.*, 2003). In addition, two XyG xylosyltransferases genes (*XXT1* and *XXT2*) were first identified in *Arabidopsis* through the enzymatic activity of recombinant proteins (Faik *et al.*, 2002; Cavalier & Keegstra, 2006). More recently, Cavalier *et al.* (2008) demonstrated that *xxt1* knockout mutants showed barely detectable alterations in XyG content, and *xxt2* mutants showed only modest decreases in XyG content and composition. These two genes exhibited very

similar, generally ubiquitous expression patterns, which indicate the potential for functional redundancy. This is supported by dramatic reductions in XyG content in double mutants. Cavalier *et al.* (2008) reported that *XXT1* and *XXT2* are the prime enzymes required for XyG biosynthesis as double *xxt1-1 xxt2-1* mutants contained no detectable XyGs. Mutations in a third *XXT* gene (*XXT5*) were also shown to have reduced XyG content (Zabotina *et al.*, 2008).

Arabidopsis glycosyltransferase family GT34 comprises seven glycosyltransferase genes including *XXT1*, *XXT2* and *XXT5*. The GT34 family also includes two genes with a high sequence similarity to the well-characterized α -1,6-galactosyltransferases (GMGT), which are involved in the synthesis of the side chains of galactomannan in fenugreek, lotus and coffee (Edwards *et al.*, 1999, 2004; Faik *et al.*, 2002; Pr   *et al.*, 2008). Here we study this family as a whole and we demonstrate, using a combination of approaches, that five of them (*XXT1-5*) encode XXTs, and that the loss of function of these genes, alone or in combinations, has a range of impacts on XyG composition.

Materials and Methods

Plant materials and growth conditions

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh seeds were germinated for 7 d on 1% (w/v) agar plates containing    strength Murashige and Skoog medium, and then grown in Levington's compost under the same conditions: 16 h light ($115 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at 25  C. Plant material for cell wall extractions and RNA preparation were harvested in the same way. Roots were collected from seedlings grown vertically on plates for 10 d. Hypocotyls were harvested from seedlings grown in the dark. Rosette leaves were collected from 3-wk-old plants. Cauline leaves, stems, siliques, buds, flowers and pedicels were collected from 4–5 wk-old plants. For seed and embryo samples, the seed coats were removed before further preparation.

Recombinant protein expression and purification in *E. coli*

Coding sequences without transmembrane domain were amplified by PCR and inserted into the pGEX-4T-3 vector (Amersham Bioscience) in-frame with GST tags. The numbers of 5' nucleotides removed from the start codon were 147, 147, 213, 180 and 216 for *XXT1-5* and 144 for both *AtGT6* and 7 (see primers for truncated sequence amplifications in Supporting Information Table S1). Constructs were expressed in *E. coli* (BL21) using 75 ml 2   YT media supplemented with ampicillin ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) at 15  C with shaking at 150 rpm for 2 d. For induction, IPTG was added to a final concentration of 0.5 mM and incubated for a further 24 h. Cells were harvested and resuspended in 20 ml spheroblast buffer (750 mM sucrose, 200 mM Tris-HCl and 0.5 mM EDTA, pH 8.0). Lysozyme was added to a concentration of 1 mg ml^{-1} and incubated at 4  C with shaking for 30 min. Buffer was discarded and cells were disrupted by resuspension in 5 ml PBS buffer containing 0.2 mM PMSF. Cell debris was removed by centrifugation at $16\,000 \text{ g}$ for 10 min,

and supernatants were incubated with 100   l of 50% slurry of Glutathione Sepharose 4B (Amersham Bioscience) with shaking for 30 min. Sepharose beads were collected and washed three times with 10 ml PBS. The beads were resuspended in 50   l elution buffer (20 mM reduced-form glutathione, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 120 mM NaCl) by shaking at 100 *g* for 10 min before collecting the supernatant by brief centrifugation. This elution step was repeated three times. Purified enzymes were quantified by Bradford assays with BSA standards and SDS-PAGE.

Recombinant GST-fusion protein activity assays and assay product detection using TLC

Expressed proteins were used in a form of immobilized enzymes with the glutathione beads. Approximately 0.3   g of proteins were incubated at 30  C for 18 h in a reaction mixture containing: 50 mM PIPES, pH 6.9, 0.5 mM UDP-sugar (Xyl, Gal or Glu), 20 mM β -mercaptoethanol and 150   g of oligo/poly-saccharide acceptors; or cellohexaose, 5 mM MgCl_2 , 5 mM MnCl_2 and 0.37 KBq of UDP-[^{14}C] sugar (Xyl, Gal or Glu), made up to a final volume of 25   l. The reactions were stopped by boiling at 100  C for 10 min. TLC analysis was performed using a method described by Robyt & Mukerjee (1994) and Atchokudomchai *et al.* (2006). Whatman TLC K5 chromatography (silica-gel) plates and a solvent system containing acetonitrile, 1-propanol, water and ethyl acetate at the ratio 85 : 50 : 50 : 25 by volume were used for this analysis. Reactions (5   l) were spotted on the plates 1.5 cm from the bottom and were developed for 2 h before being dried. For radioactive detection, TLC plates were exposed to a phosphor screen overnight and read using a Phosphorimager (Bio-Rad). Signal intensity was converted to quantity by calculating against UDP-[^{14}C]xylose standard curves. For colorimetric detection, TLC plates were dipped into ethanol solution containing 0.1% (w/v) α -naphthol and 5% (v/v) sulphuric acid, and dried before incubation at 120  C for 10 min.

Promoter:*GUS* fusion analysis and RT-PCR

Promoter:*GUS* fusion lines were generated using c. 1.5 kb of the 5'-upstream regions of *XXT* genes. The region was amplified from BAC clones by PCR (see Table S2 for primers), and inserted into the pHGWFS7 vector (Karimi *et al.*, 2002). *Arabidopsis* (Col-0) was transformed by floral dipping with *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) harbouring the constructs. Transformants were selected for hygromycin resistance ($35 \mu\text{g ml}^{-1}$) and at least 10 transformants for each construct were examined. GUS activity was detected by infiltrating plant tissues with staining solution (0.5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 0.5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 60 mM Na_2HPO_4 , 30 mM NaH_2PO_4 , 0.1% (w/v) Triton-X100 and 0.05% (w/v) X-Gluc) and incubation at 37  C overnight. For RT-PCR, RNA from various *Arabidopsis* tissues was treated with DNase I, and cDNA was synthesized from 1   g of total RNA using SuperscriptTM II RNase H^{  } Reverse Transcriptase (Invitrogen) with oligo-dT primer. PCR amplifications of the purified RNA were performed to ensure no gDNA

contamination. PCR reactions were performed with 1 µl of cDNA, *Taq* DNA polymerase with supplied buffer, 500 µM of dNTPs and 5 µM of each primer pair (Table S3), under conditions as follows: 94°C for 2 min, 30 cycles of (94°C for 30 s, 64–55°C for 30 s and 72°C for 30 s) and 72°C for 2 min. The annealing temperatures for *XXT1-5* and *AtGT6-7* were 64, 60, 55, 57, 65, respectively, and 55, 55°C, respectively. Genomic DNA was used as a positive control, and *18s* RNA primers were used to indicate cDNA quality.

Selection of homozygous T-DNA insertion lines

T-DNA insertion lines were obtained from two sources: The Salk Institute Genomic Analysis Laboratory and GABI-KAT. Homozygous plants of each line were identified by PCR with gene-specific primers and border primers (see primer locations in Fig. S2 and primer sequences in Table S4). All homozygous lines were tested by RT-PCR using cDNA synthesized from RNA extracts of 7 d-old seedlings to confirm the complete disruption of the genes (see primers in Table S5). Crosses were made between homozygous lines and successful crosses identified by PCR using DNA from F₁ plants before screening for double homozygous plants in the F₂ population.

Immunolabelling studies

Stem tissue was hand-sectioned and fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA) in 100 mM PIPES, pH 6.9, before further labelling. Seed samples were fixed with 1% (w/v) glutaraldehyde, 2% (w/v) PFA in 100 mM sodium cacodylate, pH 7.0, before embedding using a progressive low temperature method (VandenBosch, 1991). Sections were blocked with 3% (w/v) BSA in 100 mM PIPES buffer, pH 6.9, before incubation in primary antibody: CCRC-M1 (University of Georgia, Athens) or LM15 (XyG backbone; gift from Professor Paul Knox). Antibodies were used at 1 : 10 concentration diluted in 1% (w/v) BSA in buffer and incubated for 1 h at room temperature. After washing three times briefly and 3 × 5 min with PIPES buffer, sections were incubated in secondary antibody for 1 h at room temperature, in the dark. Secondary antibodies (anti-mouse and anti-rat conjugated to FITC; Sigma) were used at a 1 : 40 dilution in 1% BSA in PIPES buffer. Sections were washed again before viewing using a Nikon FXA microscope. For seeds, labelling was visualized by confocal microscopy (Zeiss) and lambda studies were performed to identify autofluorescence.

Xyloglucan oligosaccharide analysis

Cell walls were extracted from stems (with siliques removed) that were ground in liquid nitrogen and washed with absolute ethanol at least three times. To fractionate cell wall materials, dried samples were resuspended with 50 mM CDTA, pH 7.0, overnight at room temperature to extract a pectin-rich fraction. For hemicellulose extraction, the remaining insoluble cell wall material was incubated further in 4 M NaOH containing 1% sodium borohydride overnight, and then neutralized with glacial acetic

acid, dialysed against water and dried. Hemicellulose extracts were dissolved to a concentration of 1.5 mg ml⁻¹ in 100 mM NH₄OAc, pH 5.0, and incubated with 10 µg of *Trichoderma* XG5 xyloglucan endo-glucanase (a gift from Novozymes) overnight at room temperature. The reactions were stopped by boiling, and unhydrolysed polysaccharides were precipitated with 80% ethanol. Oligosaccharides were separated by HPAEC using a Dionex CarboPac PA-20 column with a linear gradient over 40 min starting with 100 mM NaOH and ending with 100 mM NaOAc and 100 mM NaOH at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹, and detected using a pulsed amperometric detector.

Gel permeation chromatography and iodine quantification

One milligram of hemicellulose extracts was separated on a Superose 6L column using a Smart chromatography system (Pharmacia, Stockholm, Sweden) using water as the mobile phase at 40 µl min⁻¹ flow rate, collecting 80 µl fractions. Colorimetric detection with iodine was employed to quantify XyGs (Kooiman, 1960). For XyG quantification, cell wall extracts were de-starched by hydrolysis with 10 units of thermo-stable α-amylase (Sigma) at 100°C for 15 min. Following this, the extracts were precipitated and washed using 80% ethanol before resuspension and assay with iodine. Hemicellulose extracts from stems were assayed (40 µl of 300 µg extracts in 112 µl of 20% Na₂SO₄ and 28 µl of Lugol's solution) and OD_{600 nm} measured and quantified against standard curves generated with tamarind XyGs (Dainippon Pharmaceutical Co, Osaka, Japan). The quantities obtained were expressed on mg g⁻¹ DW stem and then normalized in comparison to values from wild-type stems.

Complementation studies

Overexpression cassettes for each of the seven GT34 genes were constructed with the pH2GW7 vector (Karimi *et al.*, 2002). *xxt2-1*, *xxt5* and *xxt2-1 xxt5* double mutant plants were transformed by floral dipping. Transformants were selected for hygromycin resistance (35 µg ml⁻¹). At least 10 selected transformants from each transformation were examined by immunolabelling using CCRC-M1 in stem sections.

Gene numbers

The gene numbers of the GT34 genes are: At3g62720 (*XXT1*), At4g02500 (*XXT2*), At1g74380 (*XXT5*), At1g18690 (*XXT4*), At5g07720 (*XXT3*), At4g37690 (*AtGT6*), At2g22900 (*AtGT7*).

Results

Recombinant proteins encoded by three *Arabidopsis* GT34 genes can xylosylate cello-oligosaccharides

Previous work using recombinant protein produced in *Pichia pastoris* and insect cells revealed that XXT1 and XXT2 can catalyse the transfer of xylose (Xyl) from UDP-Xyl to cellopentaose and cellohexasaccharide (Faik *et al.*, 2002; Cavalier & Keegstra, 2006).

In our hands, it proved difficult to produce detectable levels of active protein in either *P. pastoris* or in insect cells, with activity having to be determined in whole cell lysates. By contrast, we found that active protein was more reliably produced by expressing truncated proteins (lacking the N-terminal transmembrane domain) in *E. coli* as GST fusion proteins. All seven *Arabidopsis* GT34 proteins expressed in this way were purified as shown in Fig. 1(a). A 62 kDa protein band that co-purifies is likely to be the bacterial chaperonin GroEL (Hou *et al.*, 2004), which is frequently observed after GST purification. Quantification using Bradford assays revealed that the yield of the purified soluble protein was in the range of 3–7 µg per 75 ml culture.

The activity of the purified enzymes was assayed using UDP-[¹⁴C]Xyl and cellohexaose as substrates, as previously reported (Cavalier & Keegstra, 2006), except that the proteins were immobilized on glutathione beads, and the radioactive products were analysed by TLC and autoradiography. From the seven proteins, xylosyltransferase activity was observed for XXT1 and XXT2 as reported previously (Cavalier & Keegstra, 2006), and also for AtGT4 (Fig. 1b), now referred to as XXT4. The measurement of the radiolabelled product by densitometry of the TLC plates indicated that XXT1 and XXT2 showed strong activity (*c.* 88% and 66% of radiolabelled substrate incorporated into cellohexaose, respectively), with XXT1 consistently higher than XXT2, while XXT4 activity was lower (*c.* 40% incorporation). Product analysis of XXT4 activity using nonradiolabelled

UDP-Xyl by mass spectroscopy showed that XXT4 could incorporate up to three Xyl moieties to cellohexaose acceptors (Fig. S1).

No activity with UDP-Xyl was observed from the other four enzymes although a range of acceptors, including cellopentaose, cellohexaose, tamarind-XyGs, de-galactosylated tamarind-XyGs and hemicellulose extracts from *xtt2-1* and *xtt5* mutants were tried. We also tested these enzymes with various UDP-[¹⁴C] sugars and monosaccharide acceptors (single sugar assays) as suggested by Egelund *et al.* (2006), in all combinations based on cell wall polysaccharide linkages, but no incorporated products were observed (Table S6).

Expression analysis indicates the potential for functional redundancy amongst *XXT* genes

With at least four GT34s encoding XXTs, there is a clear potential for functional redundancy amongst family members. To examine this, we characterized the gene expression patterns of family members using promoter:*GUS* fusions and RT-PCR. The *GUS* expression results presented in Fig. 2 are representative of those seen in at least 10 transformants obtained from each gene. We provide both an overall view of the expression pattern of whole seedlings and images of specific tissues where *GUS* expression was observed for each gene. *XXT1*, *XXT2* and *XXT5* showed similar expression patterns (Fig. 2a,b,d). All three promoters drove *GUS* expression in most tissues including leaves, roots and stems. *GUS* expression was particularly strong in actively growing tissues. The three genes showed subtle variations in expression in flowers and developing seed and these are presented in Fig. 2. During embryo development, *XXT1*:*GUS* expression was very low at early stages and localized to the seed coat and endosperm, but became more apparent as the embryo reached maturity, while *XXT2*:*GUS* expression was strong in early developing embryos, declined with maturation, and was absent from the seed coat and endosperm. By contrast, *XXT5*:*GUS* expression was strong throughout seed development and was present in the seed coat and embryo. RT-PCR confirmed the rather ubiquitous expression patterns of these three genes (Fig. 2e). By contrast, *XXT4*:*GUS* expression was observed only in the rosette, pedicel and the vascular tissues of the stem (Fig. 2c). Conversely, no *XXT3*:*GUS* expression was detected, even though this *GUS* expression line was generated in the same way as others. RT-PCR indicated that *XXT3* is expressed in several specific tissues, including stem 2 and floral buds (Fig. 2e).

Characterization of T-DNA insertion mutants of the *Arabidopsis* *XXT* genes

Although the analysis of *XXT1*, *XXT2* and *XXT5* insertion lines has been reported previously by Cavalier *et al.* (2008) and Zabolina *et al.* (2008), we characterized additional single and double mutants generated in this study to allow extensive comparisons of the effects of gene knockout of *XXT* genes. The T-DNA insertion positions of these lines are shown in Fig. S2. Homozygous insertion lines of the five *XXT* genes were identified

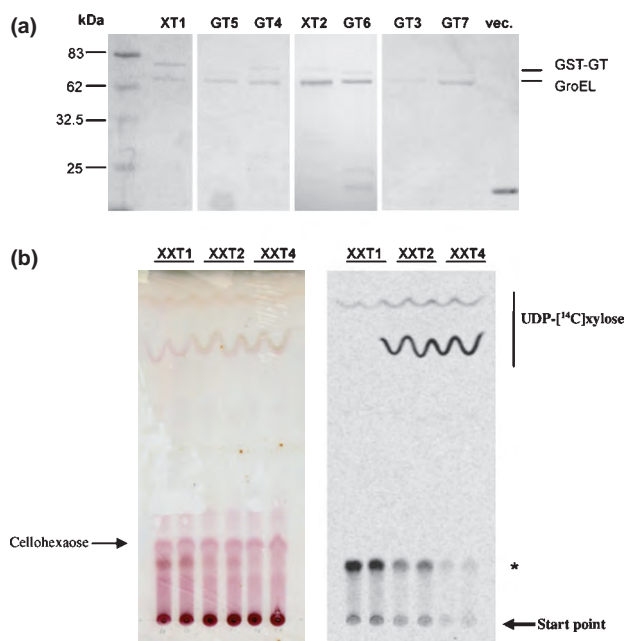


Fig. 1 Expression of *Arabidopsis* GT34 family members as GST-fusion proteins in *Escherichia coli* and analysis of enzyme reaction products. (a) SDS-PAGE separation of GST-Sepharose purified GT34 family proteins-GST fusion produced in *E. coli* cells (upper band) and a co-purifying bacterial chaperonin (lower band). (b) α -naphthol staining of TLC separation of enzyme reaction products (left panel). Autoradiograph obtained from the same TLC separation (right panel). The asterisk indicates the position of products generated by incubation with UDP-[¹⁴C]xylose (two sharp wavy lines) and cellohexaose as acceptor for GST-*XXT1*, GST-*XXT2* and GST-*XXT4*.

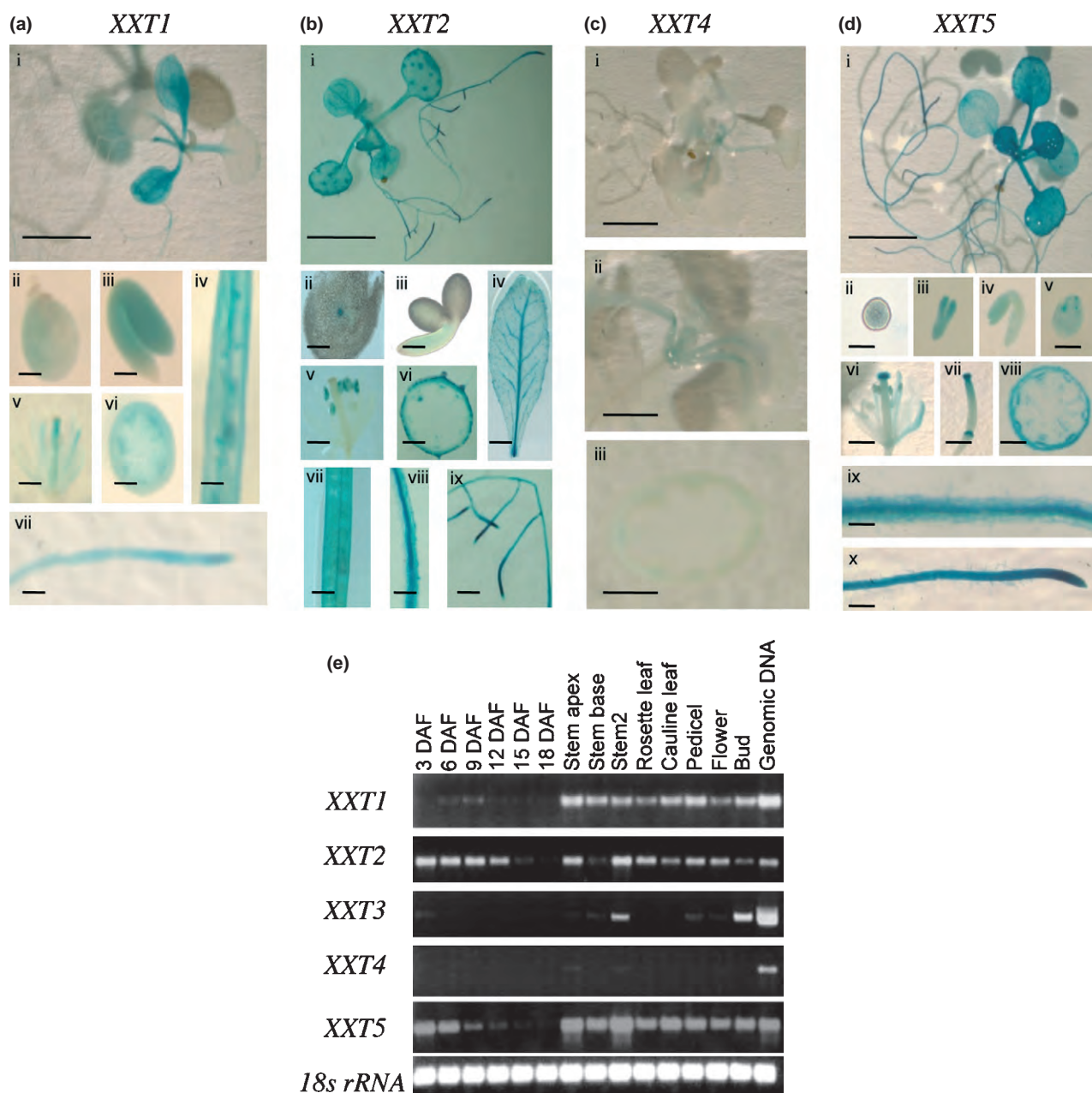


Fig. 2 Expression of *XXT* genes revealed by staining of *Arabidopsis* plants transformed with promoter-*GUS* fusions and by RT-PCR studies. (a) *XXT1*: i, 14-d-old seedling; ii, seed coat; iii, mature embryo; iv, silique; v, flower; vi, stem; vii, root. Bars: i, 4 mm; ii, iii, vi, 0.1 mm; iv, v, vii, 1 mm. (b) *XXT2*: i, 14-d-old seedling; ii, globular stage embryo; iii, mature embryo; iv, leaf; v, flower; vi, stem; vii, silique; viii, root; ix, root. Bars: i, 4 mm; ii, iii, vi–viii, 0.1 mm; iv, 10 mm; v, ix, 1 mm. (c) *XXT4*: i, 14-d-old seedling; ii, rosette; iii, stem. Bars: i, 4 mm; ii, 2 mm; iii, 0.2 mm. (d) *XXT5*: i, 14-d-old seedling; ii, globular stage embryo; iii, torpedo stage embryo; iv, mature embryo; v, seed coat; vi, flower; vii, silique; viii, stem; ix, root; x, root tip. Bars: i, 4 mm; ii, 50 μ m; iii–v, 0.2 mm; vi, 1 mm; vii–ix, 0.1 mm; x, 0.3 mm. (e) Reverse transcriptase-PCR analysis of transcript abundance for *XXT* genes in developing seeds and mature tissues of *Arabidopsis*. DAF, days after flowering.

by PCR, with RT-PCR to confirm them as null alleles (Fig. S3). We were unable to obtain a true null allele of *XXT3* as the only available line with an insertion targeting this gene appeared to produce a normal *XXT3* transcript, as determined by RT-PCR. Note that the *xxt1* mutants used here, designated *xxt1-2* and *xxt1-3*, are allelic to the *xxt1-1* mutant used by Cavalier *et al.* (2008). No obvious alterations in growth or development were observed in any of the confirmed mutants. Further observation by profiling the monosaccharide content of cell walls revealed

that *xxt2-1*, *xxt2-2* and *xxt5* had reduced levels of Xyl in cell walls in a range of tissues, with the most dramatic reductions in stems, embryos and seedlings (data not shown). These, however, agreed with previous work reported by Cavalier *et al.* (2008) and Zabolina *et al.* (2008). Because of the potential for genetic redundancy among *XXT* genes, we generated double mutants by crossing these lines (Fig. 3). Double homozygous lines were readily recovered from F_2 generations at the 1 : 3 expected ratio (see Fig. S4 for genotypic identifications).

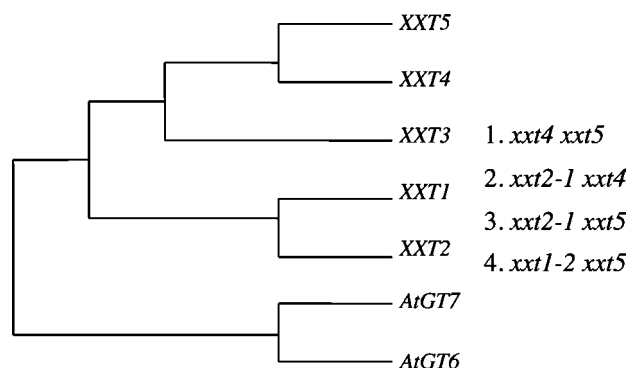


Fig. 3 Double T-DNA insertion mutants generated by crossing. Phylogenetic trees were constructed using predicted protein sequences generated in ClustalW (European Bioinformatics Initiative, Hinxton, UK). Double mutants are listed on the right.

xxt knockout lines show alteration in XyG immunolabelling

Immunolabelling of the *xxt* mutants using antibodies recognising XyGs and galactomannans revealed that both the *xxt2-1* and *xxt5* mutants showed a reduction in the labelling of stem and embryo tissues with CCRC-M1 antibody (which recognizes fucosylated-XyGs; Puhlmann *et al.*, 1994) and with LM15 antibody (which binds to the XyG backbone; Marcus *et al.*, 2008), when compared to the wild-type (Fig. 4). In the wild-type, both antibodies show a similar labelling pattern (albeit with slightly less intensity for the LM15) where specific labelling is observed at the cell walls of phloem, vascular cambium and primary xylem tissues in stems and throughout the cell walls of embryos (Fig. 4). By contrast, in stem sections of *xxt2-1* and *xxt5* mutants, neither antibody recognized the phloem nor the vascular cambium, and labelling in the primary xylem was markedly reduced (Fig. 4). Immunolabelling of *xxt1-2 xxt5* and *xxt2-1 xxt5* double mutants revealed a further reduction in XyG epitopes in both stem and embryo sections, with a complete absence of detectable labelling in primary xylem, as compared to the reduced level seen in the *xxt2* and *xxt5* single mutants. Similarly, little or no labelling was detectable in the cell walls of the double *xxt1-2 xxt5* and *xxt2-1 xxt5* mutant embryos. In the *xxt1* and *xxt5* mutants, immunolabelling with either antibody resulted, predominantly, in cytoplasmic fluorescence, rather than labelling at the cell wall. When comparing the fluorescence between *xxt5* and double *xxt1-2 xxt5* mutants, the marker was most evident at the cell walls of *xxt5* in certain areas of the embryo sections in a patchy fashion for both antibodies. The labelling apparent in the cytoplasm using both antibodies could indicate the presence of nonsecreted XyGs in the embryos or could be a nonspecific signal. The *xxt4* mutants were indistinguishable from wild-type. Similarly, *xxt4 xxt2*, and *xxt4 xxt5* double mutants were indistinguishable from *xxt2* and *xxt5* single mutants (data not shown).

Extractable XyG content in *xxt* mutants

Iodine staining has previously been shown to be specific for XyG in cell wall extracts (Kooiman, 1960) and has been employed for quantifications of XyGs from a range of plant species (Hsu &

Reeves, 1967; Gould *et al.*, 1971). Thus, we used this method to quantify the amount of XyG in de-starched alkaline extracts from mutant and wild-type stem cell walls. This revealed that extractable XyG content is reduced by 32% and 50% in *xxt2-1* and *xxt5* respectively, compared to wild-type (Fig. 5). In double mutants for *xxt2-1* × *xxt5* and *xxt1-2* × *xxt5*, XyG content was reduced further to levels < 40% of the wild-type. Although a slight reduction was observed in the *xxt1-2* mutant, no detectable decrease was observed in *xxt4*, and the crossing of *xxt4* into the other *xxt* backgrounds had no apparent additive effect on XyG content.

Analysis of XyG oligosaccharides from cell walls of *xxt* mutants

Profiling of the oligosaccharides generated by XyG-endoglucanase digestion and HPAEC-PAD revealed a complexity of changes in the side-chain distributions of XyG in the various *xxt* mutants. The result showed that the ratios of oligosaccharide products of digestion were altered in most mutants (Fig. 6), but as in other analyses, the *xxt1-2* was indistinguishable from wild-type. By contrast single mutants of *xxt2-1* and *xxt4* both exhibited a similar change in the ratio of oligosaccharides compared to wild-type, in which the relative levels of XXXG were reduced. Concomitant increases in levels of XXFG and XLXG are observed in these lines. A similar pattern was apparent in the *xxt2-1 xxt4* double mutant. By contrast, the changes in oligosaccharide profiles from the cell walls of the *xxt1-2 xxt5* double mutants revealed a dramatic alteration whereby the relative levels of all galactosylated and fucosylated oligosaccharides were considerably lower with much higher levels of XXXG.

Molecular mass distribution of XyG in *xxt* mutants

We used gel permeation chromatography (GPC) of de-starched alkaline extracts detected by iodine staining to look for changes in the molecular mass distribution of XyGs from stem cell walls of the various mutants (Fig. 7). As well as changes in XyG -epitopes and content, there are also changes in the sizes of extractable XyGs in some of the mutants. Although the XyG profile from *xxt1-2* mutants was indistinguishable from wild-type, the profiles from *xxt2-1* and *xxt5* were clearly altered from the wild-type and both showed a marked decrease in higher molecular mass components, compared to the wild-type profile. The profile for *xxt4* was also notably different from wild-type with a substantial decrease in high molecular mass XyGs and a peak in the mid-range rather than at the low molecular mass end as seen in *xxt2-1* and *xxt5*. The profile of XyGs from *xxt2-1 xxt5* double mutants showed a further loss of mid-range and high molecular mass XyGs compared to either single mutant. In spite of the *xxt1-2* profile being unchanged, the profile from the *xxt1-2 xxt5* double mutant revealed even more dramatic changes than the *xxt5* single mutant profile, and generally showed the most dramatic differences compared to wild-type, with an even stronger effect than that seen in the *xxt2-1 xxt5* double mutant.

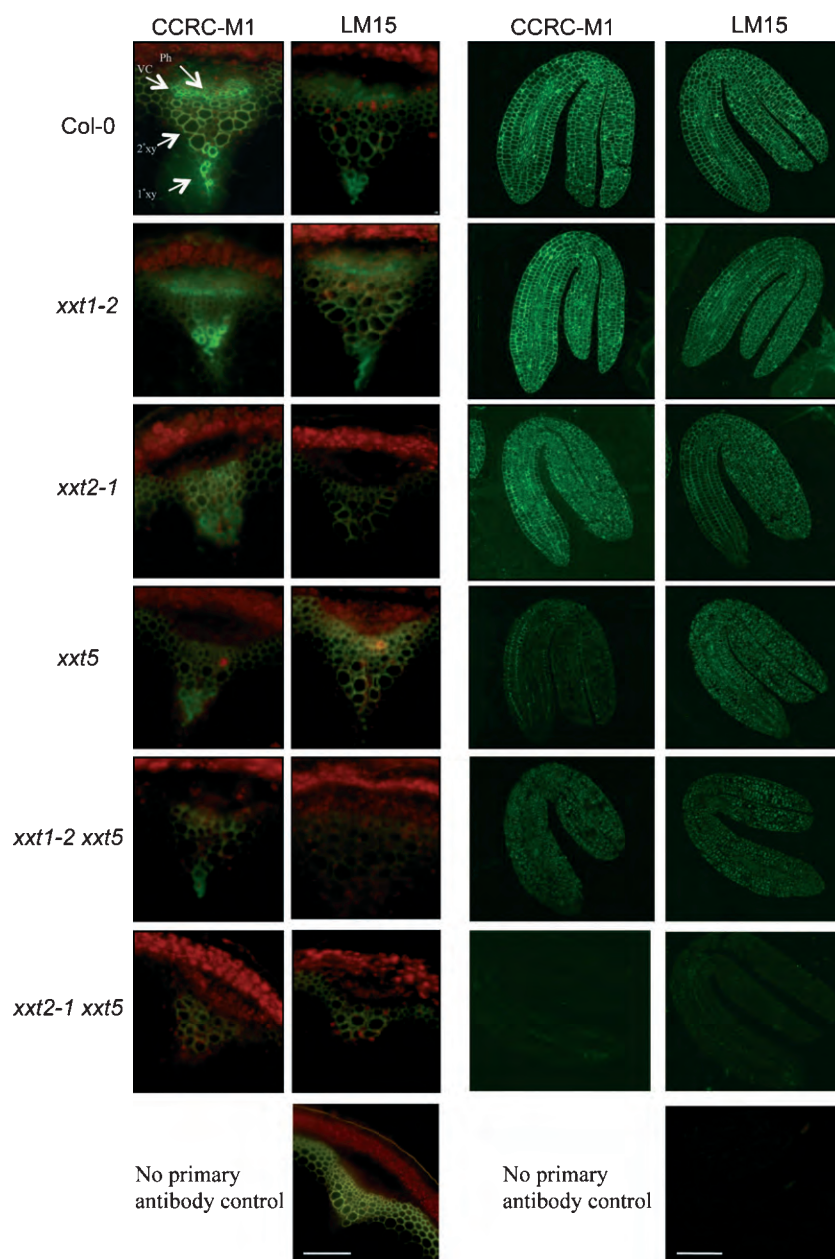


Fig. 4 Immunofluorescence labelling of stem and embryo sections of *Arabidopsis xxt* mutants using xyloglucan-specific antibodies (CCRC-M1 and LM15). Labelling is evident in phloem (Ph), vascular cambium (VC) and primary xylem (1°xy), whilst autofluorescence (probably due to lignin) is present in the secondary xylem. Negative controls (no primary antibody) of a transverse stem section (bar, 50 μ m) and a longitudinal section through a mature embryo (bar, 100 μ m) incubated with secondary antibodies are shown.

Complementation of immunolabelling phenotypes

The decrease in labelling with XyG antibodies in *xxt2-1* and *xxt5* mutants could be fully complemented by overexpressing wild-type copies of the respective genes, as illustrated in Fig. 8(a). As well as confirming the role of these two genes, this enabled us to examine the capacity of other members of the GT34s (including *AtGT6* and *AtGT7*) to complement these two mutants. We classified the observed complementation relative to that of *XXT2* and *XXT5* expressed in their respective mutant background (Fig. 8). *XXT1* overexpression demonstrated a strong complementation in *xxt2-1*, *xxt5* and *xxt2-1 xxt5* mutant backgrounds, whereas complementation by *XXT2* was strong in the *xxt2-1* background but weak in *xxt5* and the *xxt2-1 xxt5* double

mutant backgrounds (Table 1). Interestingly, *XXT3* strongly complemented in all three mutant backgrounds, suggesting that this gene does indeed encode an active protein for XyG biosynthesis. By contrast, complementation of the two single mutants by *XXT4* was weak and did not generate any detectable epitope in the *xxt2-1 xxt5* double mutant background. The overexpression of *XXT5* gave strong complementation in the two single mutants but only weak complementation in the double mutant. The complementary effects of two other GT34 family proteins, *AtGT6* and *AtGT7*, were also tested against the single and double mutants, but neither protein could restore any detectable XyG epitopes. This suggests that the biochemical activity of the gene products of *AtGT6* and *AtGT7* is unlikely to be XXT.

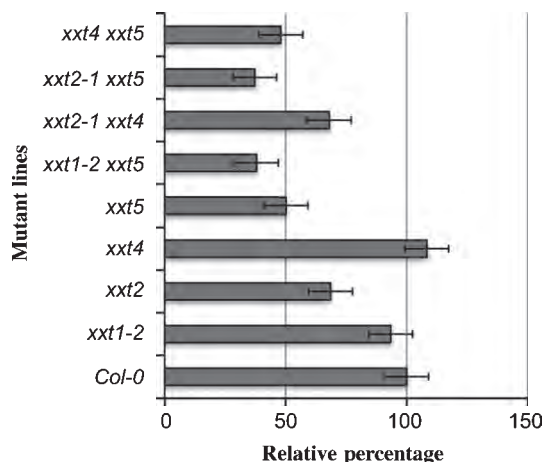


Fig. 5 Extractable xyloglucan (XyG) content of *Arabidopsis* stem *xxt* mutants quantified by iodine staining. XyG was extracted from stem cell wall material by 4 M NaOH, neutralized and treated with α -amylase, before being measured colorimetrically by iodine staining. Data are averages from three separate extracts, each extract measured in duplicate, and are presented as percentage of the content of Col-0, with SE bars shown.

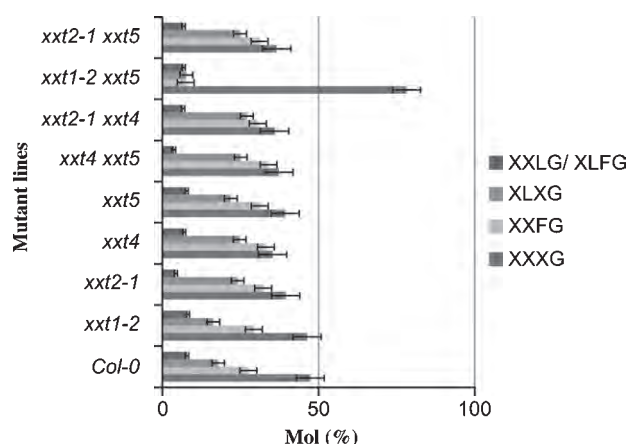


Fig. 6 Xyloglucan oligosaccharides generated from stem hemicellulose extracts of *xxt* mutants with xyloglucan-specific endoglucanase. The relative abundance of each oligosaccharide (in percentage) is derived from integrated fragment signals of the pulsed amperometric detection of oligosaccharide peaks separated by HPAEC. The data represent averages obtained from three separate extracts and digests, each of which was analysed twice, with SE bars shown. Abbreviations in the model structure represent: G, β -D-Glcp-(1 \rightarrow 4); X, α -D-Xylp-(1 \rightarrow 6); L, β -D-Galp-(1 \rightarrow 2); F, α -L-Fucp-(1 \rightarrow 2).

Discussion

Previous work has shown that three of the seven members of *Arabidopsis* GT34s encode XXTs (Cavalier & Keegstra, 2006; Cavalier *et al.*, 2008; Zabolina *et al.*, 2008). Here we demonstrate, using biochemical assays, that a fourth member (*XXT4*) encodes an XXT. Overexpression studies indicate that the final member, *XXT3*, is also an XXT. Expression studies revealed that *XXT1*, *XXT2* and *XXT5* are all expressed in most organs and at most stages of *Arabidopsis* development, while *XXT3* and *XXT4* show more specialized expression patterns. Examination of

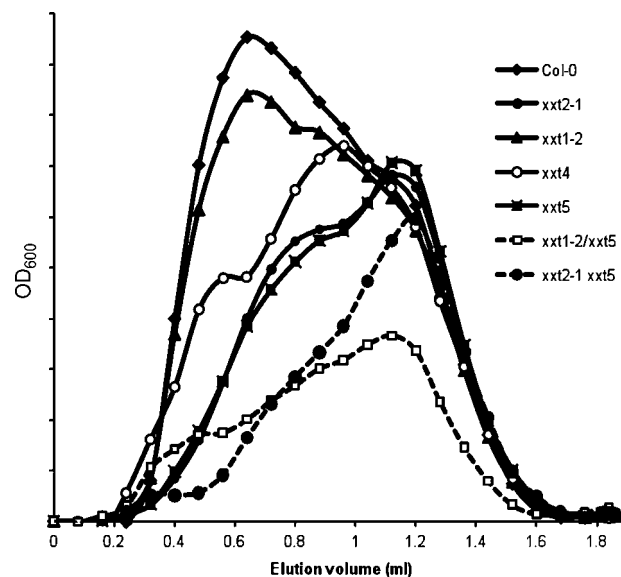


Fig. 7 Size exclusion chromatography profile of alkali-extracted xyloglucans (XyGs) from the stem of *Arabidopsis* *xxt* mutants. Stem alkali extracted XyGs were separated by size exclusion chromatography and detected by iodine staining of the eluted fractions. Results are the averages of samples from three separate extractions, with duplicate analysis.

knockout lines suggests that the loss of *XXT1* action has little discernable impact on XyG content, whereas *xxt2-1* and *xxt5* mutants show clear reductions in XyG content and changes in extractable XyG polymer size, as well as changes in side-chain patterns. In line with this, double *xxt2-1 xxt5* mutants have even lower XyG levels than the single mutants, but they still contain detectable XyG and show relatively normal growth. We obtained viable *xxt1-2 xxt5* double mutants, which showed marked decreases in XyG content compared to the *xxt5* single mutant, despite the fact that there was little difference between *xxt1-2* single mutant and wild-type. This study indicates that *XXT1*, *XXT2* and *XXT5* are the major genes responsible for XyG biosynthesis in *Arabidopsis* with *XXT3* and *XXT4* playing more restricted roles.

Previous work using *P. pastoris* and insect cells as expression systems revealed that recombinant *XXT1* and *XXT2* had *XXT* activity, but no activity was detected for other family members (Faik *et al.*, 2002; Cavalier & Keegstra, 2006). For our studies we used *E. coli* as an expression host, which enabled the demonstration of *XXT* activity for *XXT1*, 2 and 4. Using this system, we successfully produced soluble protein for all seven GT34 members by removing the coding sequence for the predicted transmembrane domain from the N-terminus, and we suggest that this may prove a fruitful system for others working with similar enzymes. However, it is not clear why activity was not obtained for *XXT3* and 5. This may reflect the complexity of XyG biosynthesis, with these enzymes perhaps only transferring Xyl to partially xylosylated substrates or requiring other specific patterns of substrate. Alternatively, these proteins may function in complexes in plant cells, which are not present in the purified recombinant proteins. Nevertheless, the reduction in XyG content in *xxt5* mutants and the complementation by *XXT3* and

Fig. 8 Immunofluorescence labelling of stem sections using xyloglucan (XyG)-specific antibodies of *Arabidopsis* *xxt* mutants expressing 35S:GT34 genes for complementation. Overexpression constructs for GT34 genes were transformed into various *xxt2* or *xxt5* mutant backgrounds to examine their ability to compensate for the loss of XyG epitopes in sections from these plants. The three panels show representative immunofluorescence level used to rank for (a) high, (b) low, or (c) no complementation as presented in Table 1. Bar, 100 μ m.

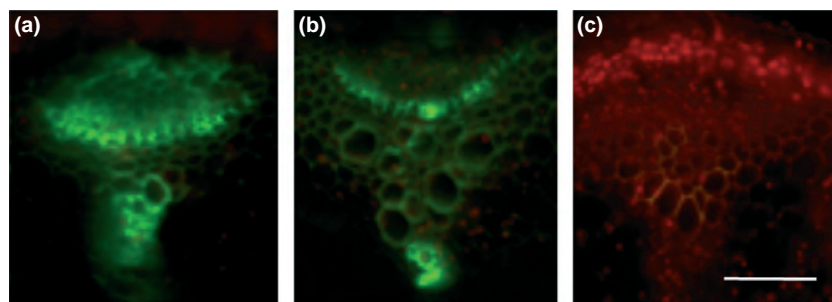


Table 1 Levels of compensation in relative abundance of XyG epitopes in stem sections of *Arabidopsis* mutant lines transformed with seven 35S:GT34 constructs compared to corresponding untransformed line

Constructs	Level of compensation in background genotype		
	<i>xxt2-1</i>	<i>xxt5</i>	<i>xxt2-1 xxt5</i>
35S:XXT1	High	High	High
35S:XXT2	High	Low	Low
35S:XXT3	High	High	High
35S:XXT4	Low	Low	None
35S:XXT5	High	High	Low
35S:GT6	None	ND	ND
35S:GT7	None	ND	ND

ND, not determined.

XXT5 overexpression of the loss of XyG in *xxt2-1*, *xxt5* and *xxt2-1 xxt5* mutant cell walls supports the case that these genes encode XXTs.

Our results demonstrate that, of seven *Arabidopsis* GT34 genes, there are at least five genes that encode XXT enzymes and a further two encoding enzymes of unknown function (*AtGT6* and *AtGT7*). This is in accord with the proposal by Faik *et al.* (2002) who compared the protein sequences of *Arabidopsis* GT34s and found them to fall into two clusters: five were grouped with those with demonstrated XXT activity and other two grouped with known galactomannan galactosyltransferase (GMGT) from fenugreek (Edwards *et al.*, 1999). We examined whether *AtGT6* and *AtGT7* could encode XXT enzymes by assaying the activity of recombinant enzymes, and by overexpressing the genes in *xxt* mutant lines to see if they could complement these lesions. Neither of these approaches indicated that *AtGT6* and *AtGT7* encode XXTs, and this, taken in conjunction with their closer similarity to known GMGTs, suggests that they are more likely to encode GMGTs but does not preclude the possibility that they might encode XXT enzymes.

The physiological role of *XXT1* appears complex. Loss of function *xxt1-2* mutants exhibited no detectable changes in XyG content despite the fact that this gene encodes the most active of the assayed recombinant XXT proteins and is expressed at high levels in most tissues of the plant. This is in line with the report by Cavalier *et al.* (2008) and analyses of *xxt1-3* mutants (data not shown). Moreover, *XXT1* can complement the loss of *XXT2*, *XXT5* and both genes in double *xxt2-1 xxt5* mutants. In addition, the loss of *XXT1* function in either an *xxt2*, or *xxt5* background has a clear effect on XyG content. In contrast, the *xxt1-2 xxt5*

double mutants grow relatively normally and show a similar reduction in XyG content to that seen in the *xxt2-1 xxt5* double mutant. Interestingly, the extractable XyG Mr distribution from the *xxt1-2 xxt5* double mutant is substantially different to that of the *xxt2-1 xxt5* or any of the other mutants. In all of the mutants with decreased XyG content, the most substantial decreases are associated with the higher Mr polymers, with the lower Mr end of the chromatograms remaining relatively unaffected, whereas the *xxt1-2 xxt5* double mutant shows reduced amounts of XyG across all the different sizes of polymer.

It is important to note that the Mr distribution of XyGs is modulated by the action of XyG modifying enzymes such as XyG transglycosylase/hydrolases (XTHs), endoglucanases (Catala *et al.*, 1997) and α -xylosidases (Sampedro *et al.*, 2010; Günl & Pauly, 2011) in the cell walls. Thompson *et al.* (1997) reported that XyGs are first synthesized as relatively low Mr polymers before being incorporated into much higher Mr polymers in the walls. Therefore, the alterations of XyG Mr observed in the mutants may not be purely the direct result of altered XyG biosynthesis, but may also be a consequence of changes in the susceptibility of the XyG to these activities. In this context it is interesting to note that altered extractable XyG Mr profiles were the only obvious change that we could find in the *xxt4* mutant, suggesting perhaps that a subtle change in XyG structure might have implications for integration of the polymer into cell walls.

Changes in XyG side-chain distributions also reflect the effect of each *XXT* knockout on xylose side-chain substitution. The mutants all showed a similar trend in that XXXG oligosaccharides were greatly reduced, while the relative abundance of oligosaccharides with galactosyl and fucosyl residues was increased. The reduced amount and the decreased relative molecular mass of XyG in the mutants suggest that the action of the xylosyltransferases is required for glucan chain elongation. It is also possible that the increased representation of galactosylated and fucosylated oligosaccharides in the XyG profiles indicates slow xylosylation in the *xxt* mutants. The reduction in galactosyl and fucosyl residues in XyG from the *xxt1-2 xxt5* could indicate that the early forms of XyG produced after xylosylation are not appropriate for further galacto- or fucosylation.

Both *XXT3* and *XXT4* appear to play restricted roles in XyG biosynthesis, and thus it seems likely that *XXT1*, 2 and 5 are responsible for producing most of the XyG in the major tissues in *Arabidopsis*. If we accept this general premise, then the presence of XyG in *xxt1-2 xxt5* and *xxt2-1 xxt5* double mutants is

likely to be produced by *XXT2* or *XXT1* working alone in the major tissues of the plants. Given that XyG in the mutants contains blocks of 3 Xyl residues both *XXT1* and *XXT2* may, individually, be capable of completing the pattern of blocks of three xylose side chains in XyGs. By contrast, it is striking that *XXT5*, which is expressed fairly ubiquitously and apparently at relatively high levels and is able to compensate for the loss of the epitopes in all the tested mutants, is unable to complement the loss of function of both *XXT1* and *XXT2*, as shown by Cavalier *et al.* (2008). This agrees with the suggestion by Cavalier *et al.* (2008) that *XXT1* and *XXT2* may be required for the chain initiation of XyG biosynthesis and that *XXT5* may lack this ability or have it at very low efficiency.

A possible explanation for *XXT3* and *XXT5* lacking XXT enzymatic activity but being able to complement the loss of XyG epitopes in the mutants is that these two enzymes may function as a part of an enzyme complex and thereby enhance the transferase activity. In a similar report Rautengarten *et al.* (2011), demonstrated that the UDP-Ara mutase protein family includes proteins with and without mutase activity, interacting in a protein complex.

In vivo, XyG xylosylation seems likely to occur in close spatial and temporal proximity to elongating glucan chains. This is because of the insolubility of β -1,4-glucans, which require xylosylation before more than five or six contiguous naked glucose residues are produced. Thus, it seems likely that the XXTs will work in close proximity to the glucan synthase in the Golgi. Partially xylosylated XyG could be the substrate for some XXTs, hence explaining the low activity when short cello-oligomers are used. Studies of the interactions between the glucan synthase and side-chain glycosyltransferases may enable us to unravel the apparent complexity of this process.

Acknowledgements

This work was supported by funds from The Garfield Weston Foundation, Kasetsart University Research and Development Institute, and The Thailand Research Fund (MRG5480289). L.D.G. was supported by funds from the European Commission Framework Programme 7 through Grant Agreement Number 211982, project RENEWALL. We are grateful to Professor Paul Knox (University of Leeds) for the donation of antibodies and Dr Kirk Schnoor (Novozymes) for the XyG-specific endoglucanase.

References

- Albersheim P, Darvill A, Roberts K, Sederoff R, Staehelin A. 2010. *Plant cell walls*. New York, NY, USA: Garland Science.
- Atichokudomchai N, Jane JL, Hazlewood G. 2006. Reaction pattern of a novel thermostable α -amylase. *Carbohydrate Polymers* 64: 582–588.
- Carpita NC, Gibeaut DM. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal* 3: 1–30.
- Catala C, Rose JKC, Bennett AB. 1997. Auxin regulation and spatial localization of an endo-1,4- β -D-glucanase and a xyloglucan endotransglycosylase in expanding tomato hypocotyls. *Plant Journal* 12: 417–426.
- Cavalier DM, Keegstra K. 2006. Two xyloglucan xylosyltransferases catalyze the addition of multiple xylosyl residues to cellohexaose. *Journal of Biological Chemistry* 281: 34 197–34 207.
- Cavalier DM, Lerouxel O, Neumetzler L, Yamauchi K, Reinecke A, Freshour G, Zabolina OA, Hahn MG, Burgert I, Pauly M *et al.* 2008. Disrupting two *Arabidopsis thaliana* xylosyltransferase genes results in plants deficient in xyloglucan, a major primary cell wall component. *Plant Cell* 20: 1519–1537.
- Cosgrove DJ. 1999. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 391–417.
- Dick-Pérez M, Zhang Y, Hayes J, Salazar A, Zabolina OA, Hong M. 2011. Structure and interactions of plant cell-wall polysaccharides by two- and three-dimensional magic-angle-spinning solid-state NMR. *Biochemistry* 50: 989–1000.
- Edwards ME, Choo TS, Dickson CA, Scott C, Gidley MJ, Reid JS. 2004. The seeds of *Lotus japonicus* lines transformed with sense, antisense, and sense/antisense galactomannan galactosyltransferase constructs have structurally altered galactomannans in their endosperm cell walls. *Plant Physiology* 134: 1153–1162.
- Edwards ME, Dickson CA, Chengappa S, Sidebottom C, Gidley MJ, Reid JS. 1999. Molecular characterisation of a membrane-bound galactosyltransferase of plant cell wall matrix polysaccharide biosynthesis. *Plant Journal* 19: 691–697.
- Egelund J, Petersen BL, Motawia MS, Damager I, Faik A, Olsen CE, Ishii T, Clausen H, Ulvskov P, Geshi N. 2006. *Arabidopsis thaliana* *RGXT1* and *RGXT2* encode Golgi-localized (1,3)- α -D-xylosyltransferases involved in the synthesis of pectic rhamnogalacturonan-II. *Plant Cell* 18: 2593–2607.
- Faik A, Price NJ, Raikhel NV, Keegstra K. 2002. An *Arabidopsis* gene encoding an α -xylosyltransferase involved in xyloglucan biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 99: 7797–7802.
- Fry SC. 1989. The structure and functions of xyloglucan. *Journal of Experimental Botany* 40: 1–11.
- Fry SC, Smith RC, Renwick KF, Martin DJ, Hodge SK, Matthews KJ. 1992. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochemical Journal* 282: 821–828.
- Gould SEB, Rees DA, Wright NJ. 1971. Polysaccharides in germination. *Biochemical Journal* 124: 47–53.
- Günl M, Pauly M. 2011. *AXY3* encodes a α -xylosidase that impacts the structure and accessibility of the hemicellulose xyloglucan in *Arabidopsis* plant cell walls. *Planta* 233: 707–719.
- Hayashi T. 1989. Xyloglucans in the primary cell wall. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 4: 139–168.
- Hou B, Lim EK, Higgins GS, Bowles DJ. 2004. N-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 279: 47 822–47 832.
- Hsu DS, Reeves RE. 1967. The structure of nasturtium amyloid. *Carbohydrate Research* 5: 202–209.
- Karimi M, Inzé D, Depicker A. 2002. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* 7: 193–195.
- Kooiman P. 1960. A method for the determination of amyloid in plant seeds. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 79: 675–678.
- Madson M, Dunand C, Li X, Verma R, Vanzin GF, Caplan J, Shoue DA, Carpita NC, Reiter WD. 2003. The *MUR3* gene of *Arabidopsis* encodes a xyloglucan galactosyltransferase that is evolutionarily related to animal exostosins. *Plant Cell* 15: 1662–1670.
- Marcus SE, Verhertbruggen Y, Herve C, Ordaz-Ortiz JJ, Farkas V, Pedersen HL, Willats WGT, Knox JP. 2008. Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biology* 8: 60–71.
- McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ. 1992. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* 4: 1425–1433.
- Park YB, Cosgrove DJ. 2012. Changes in cell wall biomechanical properties in the xyloglucan-deficient *txt1/txt2* mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 158: 465–475.
- Park YW, Tominaga R, Sugiyama J, Furuta Y, Tanimoto E, Samejima M, Sakai F, Hayashi T. 2003. Enhancement of growth by expression of poplar cellulase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 33: 1099–1106.

- Perrin RM, DeRocher AE, Bar-Peled M, Zeng W, Norambuena L, Orellana A, Raikhel NV, Keegstra K. 1999. Xyloglucan fucosyltransferase, an enzyme involved in plant cell wall biosynthesis. *Science* **284**: 1976–1979.
- Pré M, Caillet V, Sobilo J, McCarthy J. 2008. Characterization and expression analysis of genes directing galactomannan synthesis in coffee. *Annals of Botany* **102**: 207–220.
- Puhlmann J, Bucheli EM, Swain J, Dunning N, Albersheim P, Darvill AG, Hahn MG. 1994. Generation of monoclonal antibodies against plant cell wall polysaccharides. I. Characterization of a monoclonal antibody to a terminal -(1,2)-linked-fucosyl-containing epitope. *Plant Physiology* **104**: 699–710.
- Rautengarten C, Ebert B, Herter T, Petzold CJ, Ishii T, Mukhopadhyay A, Usadel B, Scheller HV. 2011. The interconversion of UDP-arabinopyranose and UDP-arabinofuranose is indispensable for plant development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 1373–1390.
- Robyt JF, Mukerjee R. 1994. Separation and quantitative determination of nanogram quantities of maltodextrins and isomaltodextrins by thin layer chromatography. *Carbohydrate Research* **251**: 187–202.
- Sampedro J, Pardo B, Gianzo C, Guitián E, Revilla G, Zarra I. 2010. Lack of α -xylosidase activity in *Arabidopsis* alters xyloglucan composition and results in growth defects. *Plant Physiology* **154**: 1105–1115.
- Thompson JE, Smith RC, Fry SC. 1997. Xyloglucan undergoes interpolymeric transglycosylation during binding to the plant cell wall *in vivo*: evidence from $^{13}\text{C}/^3\text{H}$ dual labelling and isopycnic centrifugation in caesium trifluoroacetate. *Biochemical Journal* **327**: 699–708.
- VandenBosch KA. 1991. Immunolabelling. In: Hall JL, Hawes C, eds. *Electron microscopy of plant cells*. London, UK: Academic Press, 181–218.
- Vanzin GF, Madson M, Carpita NC, Raikhel NV, Keegstra K, Reiter WD. 2002. The *mur2* mutant of *Arabidopsis thaliana* lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase *AtFUT1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **99**: 3340–3345.
- Zabackis E, Huang J, Muller JB, Darvill AG, Albersheim P. 1995. Characterization of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Physiology* **107**: 1129–1138.
- Zabotina OA, van de Ven WTG, Freshour G, Drakakaki G, Cavalier D, Mouille G, Hahn MG, Keegstra K, Raikhel NV. 2008. *Arabidopsis XXT5* gene encodes a putative 1,6-xylosyltransferase that is involved in xyloglucan biosynthesis. *Plant Journal* **56**: 101–115.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Fig. S1 Mass spectra analysis of XXT4 reaction products demonstrating xylosyltransferase activity towards celohexaose substrate.

Fig. S2 Illustration of T-DNA insertion positions in the *xxt* mutants used in this study.

Fig. S3 Identification of homozygous T-DNA insertion lines of the *Arabidopsis* GT34s by PCR amplification.

Fig. S4 Identification of double knock-out lines.

Table S1 Oligonucleotide primers for PCR amplification of nontransmembrane region coding sequences of GT34s for GST-GT34 constructs

Table S2 Oligonucleotide primers for PCR amplification of the five *XXT* 5' upstream regions

Table S3 Oligonucleotide primers for RT-PCR amplification of *XXT* genes

Table S4 Forward and reverse PCR primers for T-DNA insertion homozygous line screening

Table S5 Oligonucleotide primers for RT-PCR amplification of T-DNA insertions disrupting *Arabidopsis XXT* genes

Table S6 Combinations of UDP-[^{14}C]sugar substrates and UDP-sugar/mono/oligo/polysaccharide acceptors used in assays for screening of *Arabidopsis* GT34 enzyme activity

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.