การใช้ยีนสร้างแอนโทไซยานินเป็นยีนเครื่องหมายสำหรับการถ่ายยีนในพืชและเป็นยีนเป้าหมายเพื่อเพิ่มมูลค่าพืชเศรษฐกิจ

The use of a gene for production of anthocyanin pigment as a marker gene in plant transformation and as a target gene for increased value in crop plants

ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์[1] ศรีเมฆ ชาวโพงพาง[2] แสงทอง พงษ์เจริญกิต[1]
และ วราภรณ์ แสงทอง แสงทอง[1]

Chotipa Sakulsingharoj[1], Srimek Chowpongpang[2], Saengtong Pongjaroenkit[1]
and Varaporn Sangtong[1]

[1]สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290
[2]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กทม. 10900

บทคัดย่อ

การถ่ายยีนเข้าสู่พืชส่วนใหญ่มีการใช้ยีนด้านสารปฏิชีวนะเข้ามาช่วยในการคัดเลือกชิ้นส่วนพืชที่ได้รับยีน ซึ่งทำให้เกิดความวิตกกังวลในเรื่องการถ่ายทอดยีนออกสู่สิ่งแวดล้อมรวมทั้งความเสี่ยงต่อมนุษย์และสัตว์ งานวิจัยนี้จึงได้ทดลองใช้ยีนสร้างสีมาช่วยคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน โดยได้ทำการถ่ายยีนควบคุมการสร้างแอนโทไซยานิน ซึ่งคือยีน *pap1* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kitaake โดยใช้อะโกรแบคทีเรียม พบว่า ต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนมีลักษณะสีเขียวเช่นเดียวกับต้น wide-type เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบส แสดงว่าเป็นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน *pap1* แทรกอยู่ในจีโนม จากนั้นยืนยันผลด้วยเทคนิค Southern blot พบว่า ข้าวทั้ง 3 ต้นที่วิเคราะห์มีการแทรกตัวของยีน *pap1* จำนวน 1 ชุด และมีตำแหน่งต่างกัน เมื่อตรวจสอบการถ่ายทอดยีนด้านสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินไปสู่รุ่นลูก T_1 พบว่า ได้อัตราส่วน 3:1 ซึ่งเป็นไปตามกฎของมนเดลเมื่อยีนแทรกในจีโนม 1 ชุด เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *pap1* โดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR และ Real time RT-PCR พบว่า ต้นข้าวทั้ง 3 ต้นมีการแสดงออกของยีนใกล้เคียงกัน และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องใน pathway การสังเคราะห์แอนโทไซยานิน พบว่า ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมมีการแสดงออกของยีนโครงสร้างเหล่านี้ไม่แตกต่างจากต้น wide-type ซึ่งคาดว่ายีน

pap1 ไม่สามารถทำหน้าที่ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้ ส่งผลให้ต้นข้าวไม่เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

นอกจากนี้ได้ถ่ายยีน *pap1* เข้าสู่ยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ด้วยอะโกรแบคทีเรียม ได้ยาสูบที่มีต้นสีเขียว เขียวปนแดง และแดง เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่า ต้นยาสูบเหล่านี้มียีน *pap1* และยืนยันผลด้วย southern blot พบว่า ต้นเขียวและต้นเขียวปนแดงมียีน *pap1* แทรกในจีโนม 1 ชุด แต่ตำแหน่งต่างกัน ส่วนต้นแดงมียีนแทรกในจีโนม 3 ชุด เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *pap1* ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR และ Real time RT-PCR พบว่า ต้นยาสูบสีแดงมีการแสดงออกของยีน *pap1* มากที่สุดสอดคล้องกับผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินด้วยเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์ พบว่า ต้นยาสูบสีแดงมีการแสดงออกของยีนโครงสร้างต่างๆ มากกว่าต้นเขียวปนแดง ต้นเขียว และต้น wide-type ซึ่งส่งผลให้ต้นยาสูบเกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน จากงานวิจัยนี้พบว่า สามารถนำยีน *pap1* ซึ่งควบคุมการสร้างแอนโทไซยานินไปใช้เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือกยาสูบที่ได้รับยีน แทนการใช้ยีนต้านสารปฏิชีวนะได้โดยการคัดเลือกจากการเกิดสีแดง เนื่องมาจากการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

คำสำคัญ: ข้าว, ยาสูบ, ยีน *pap1*, แอนโทไซยานิน, ยีนเครื่องหมาย, การถ่ายยีน

Abstract

Antibiotic resistant genes were generally used in plant gene transfer system to select transgenic cells or tissues. There are public concerns about those genes in human health and environments. In this research, a gene for production of anthocyanin pigment (*pap1*) was investigated for the use as selectable marker gene in transformation of rice. Transformation of rice CV. Kitaake with *pap1* gene was conducted by *Agrobacterium*. The results showed that transformed rice plants had no anthocyanin pigmentation phenotypes as wild-type plants. Transformed plants showed PCR products of 400 bp, indicating the presence of *pap1* gene in their genome. Southern blot analysis confirmed that three transgenic plants were independent lines containing a single copy of *pap1* gene in their genome. Segregation analysis indicated the phenotypic ratio of T_1 plants were 3:1, following Mendelian law for a single gene insertion site at

a locus. Gene expression levels were investigated by semi-quantitative RT-PCR and Real time RT-PCR. Three rice lines expressed *pap1* gene and other structural genes involved in anthocyanin biosynthesis pathway at similar levels compared to wild-type plants. Transgenic rice plants had no accumulation of anthocyanin and also showed no increase in expression of structural genes. These results were probably due to *pap1* gene cloned from *Arabidopsis*, which is dicot, may not be able to activate structural genes in rice, which is monocot, and subsequently resulted in no anthocyanin biosynthesis in transgenic rice plants.

In this study, leaf explants of tobacco cv. burley were transformed with *pap1* gene by *Agrobacterium* method. Transformed tobacco plants showed different phenotypes of anthocyanin pigmentation including green, green-red and red color in their leaves. These transformed tobacco plants were analyzed by PCR technique to investigate the integration of *pap1* gene in plant genome. The PCR positive results were confirmed by Southern blot analysis. It was found that the green and green-red tobacco plants analyzed had a single copy of *pap1* gene in their genome but the red plants had 3 copies of *pap1* gene in the genome. Analysis of gene expression by semi-quantitative RT-PCR and Real time RT-PCR showed that the red tobacco plants revealed the highest levels of expression of *pap1* gene and also structural genes in anthocyanin pathway. Expression results were consistent with anthocyanin contents in the red transgenic tobacco plants appearing the most accumulation of anthocyanin level. Overall results from this research suggested that the *pap1* gene, which controls anthocyanin production, can be used as a selectable marker gene in transformation of tobacco but not rice.

Keywords: rice, tobacco, *pap1* gene, anthocyanin, marker gene, transformation