กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์ และ ผศ.ดร. รจนา โอภาสศิริ ผู้ร่วมวิจัย และที่ปรึกษาโครงการ ขอขอบคุณ อ.ดร. จิราภา เพชรสม และ น.ส. วิภาภรณ์ วรรณธนาเลิศ สำหรับข้อมูลในรายงานวิจัยนี้ และ ขอขอบคุณ น.ส. ดาราวรรณ ร่วมกุศล สำหรับการบริหารจัดการ ขอบคุณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่เอื้ออำนวยสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์สำหรับการปฏิบัติงาน ขอบคุณ คุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ ที่ช่วยดูแลทางด้านการเงินของโครงการวิจัยนี้ และการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2548-2550

หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อ (1) ศึกษาการแสดงออกของยีนกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลสในอะเรย์ข้าวขนาด 45 K เพื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล ในอะเรย์ 45 K ของข้าวมีโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะต่อไกลโคซิลไฮโดรเลสกลุ่มที่ 1 ทั้งสิ้น 26 กลุ่ม แต่มีเพียง 11 กลุ่มที่ตรงกับฐานข้อมูล เมื่อทำให้ข้าวอยู่ในสภาวะเครียด เทียบกับสภาวะปกติ มียีนที่มีการแสดงออกที่มีความแตกต่างกันลดลงตั้งแต่ 2 เท่าขึ้นไปเพียง 5 กลุ่ม (*Os5bglu*19 *Os9bglu*31 *Os9bglu*30, *Os*11*bglu*36 และ *Os*1*bglu*5) และมีเพียง 3 กลุ่ม (*Os*4*bglu*18 *Os*3*bglu*6 และ *Os*7*bglu*26) ที่มีการแสดงออกแบบเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 2 เท่าขึ้นไป (2) ศึกษาหน้าที่ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสจำนวน 5 ยีน คือ *Os*1*bglu*1 *Os*3*bglu*7 *Os*3*bglu*8 *Os*7*bglu*26 และ *Os*12*bglu*38 ด้วยเทคนิคอาร์เอ็นเอไอ ได้ทำการยับยั้งการแสดงออกของเบต้ากลูโค-ซิเดสทั้ง 5 ยีนพร้อมกัน โดยใช้ส่วนของ coding region ที่มีความเหมือนกันทั้ง 5 ยีน และยับยั้งการแสดงออกของแต่ละยีนโดยใช้ส่วนของ 3'UTR ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงกับยีนเบต้ากลูโคซิเดสแต่ละตัว ยีนเป้าหมายถูกใส่เข้าไปในเวคเตอร์ pHELLSGATE8 และส่งเข้าไปในแคลลัสของข้าวโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium* เพื่อสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ในข้าว การชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหารเพาะเลี้ยง N6D เป็นระยะเวลา 4 ถึง 6 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ KDML105 และข้าวโคชิฮิคาริ ที่ 94.5 และ 93.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของข้าว คือ การบ่มแคลลัสร่วมกับแบคทีเรีย *Agrobacterium* ในอาหารเพาะเลี้ยง infection medium การคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือก N6D พบว่าสามารถถ่ายโอนยีนเข้าสู่แคลลัสของข้าวได้โดยพบแถบของดีเอ็นเอเป้าหมายของ *nptII* ในแคลลัสจากการทำการเพิ่มสายดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แคลลัสที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด

ของชุดทดสอบควบคุม มีประสิทธิภาพในการถ่ายโอนมากที่สุด ที่ 19.7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแคลลัสที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดจากชุดทดสอบอื่นมีค่าอยู่ระหว่าง 15.3 ถึง 15.9 เปอร์เซ็นต์ การแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอในแคลลัสที่ผ่านการยับยั้งการแสดงออกของแต่ละยีน พบว่าไม่มีการแสดงออกของเอ็ม-อาร์เอ็นเอของยีนนั้นๆ ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *Os*1*bglu*1 *Os*3*bglu*8 และ *Os*7*bglu*26 แต่ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *Os*3*bglu*7 ยังพบการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอในระดับที่ต่างกันในแคลลัส ส่วนยีน *Os*12*bglu*38 นั้นปกติจะไม่พบการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอในแคลลัส การตรวจสอบกระบวนการอาร์เอ็นเอไอที่เกิดขึ้นในแคลลัสโดยใช้ Northern blot เพื่อตรวจหาเอสไอ-อาร์เอ็นเอพบว่าแคลลัสของแต่ละชุดทดสอบที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน *Os*1*bglu*1 *Os*3*bglu*8 *Os*7*bglu*26 และ *Os*3*bglu*7 สามารถตรวจพบเอสไออาร์เอ็นเอได้ในระดับที่แตกต่างกัน แต่ไม่พบในแคลลัสที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิดของชุดทดสอบควบคุม การชักนำให้เกิดการพัฒนาไปเป็นต้นข้าวของแคลลัสบนอาหารเพาะเลี้ยง พบว่าเฉพาะแคลลัสที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดของชุดทดสอบควบคุมและแคลลัสของชุดทดสอบที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน *Os12bglu38* สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นข้าวได้ 5.5 และ 3.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบแถบของดีเอ็นเอเป้าหมายของ *nptII* ในตัวอย่างต้นข้าวทุกตัวอย่างจากทั้ง 2 ชุดทดสอบ แต่ไม่พบความแตกต่างของลักษณะต้นข้าวที่ปรากฏของต้นข้าวที่ได้รับถ่ายโอนพลาสมิดของชุดทดสอบควบคุม และชุดทดสอบที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน *Os*12*bglu*38 เลย

Abstract

This research attempted to study (1) the expression of Glycosyl Hydrolase in 45 K array to compare with databases. The study found 26 groups of Glycosyl Hydrolase family I in the 45 K array with only 11 groups similar to the NCBI databases. The expression of these genes under stress conditions indicated that only 5 groups (*Os*5*bglu*19, *Os*9*bglu*31, *Os*9*bglu*30, *Os*11*bglu*36 and *Os*1*bglu*5) decreased 2 folds or more and 3 groups (*Os*4*bglu*18, *Os*3*bglu*6 and *Os*7*bglu*26) increased 2 folds or more when compare to the normal condition. (2) The function of 5 β-glucosidase genes (*Os*1*bglu*1, *Os*3*bglu*7, *Os*3*bglu*8, *Os*7*bglu*26 and *Os*12*bglu*38) was studied by RNAi technique. The suppression of 5 β-glucosidase genes were knocked down with one construct containing a highly conserved coding region that matched all 5 genes. And individual β-glucosidase genes were knocked down with 3'UTR sequences of each gene. The target genes fragment were cloned into the pHELLSGATE8 vector and then transferred into rice calli via *Agrobacterium* to produce dsRNA in rice. High percentages of effective callus induction of 94.5% and 93.4% were obtained when seeds of rice cv. KDML105 and Koshihikari were cultured on N6D medium for 4-6 weeks at 28^{o}C, respectively. The suitable conditions for rice transformation with *Agrobacterium* were to grow the calli on N6D selection medium and then checked for the presence of the *npt*II gene to confirm the integration of T-DNA fragment in the calli. High transformation efficiency of 19.7% was obtained from the calli transformed with control plasmid while the individual gene knock down constructs had transformation efficiencies of about 15.3-15.9%. Expression of *Os*1*bglu*1, *Os*3*bglu*8 and *Os*7*bglu*26

mRNA was not found in calli transformed with their respective knock down constructs. However, *Os*3*bglu*7 still shows mRNA expression at different levels after transformation with its knock down construct. The mRNA expression of *Os*12*bglu*38 was not found in normal nontransformed callus. Northern blot analysis was performed to check the presence of siRNA to confirm the RNAi mechanism in calli. The results indicated that different siRNA levels were found in the calli with the *Os*1*bglu*1, *Os*3*bglu*8, *Os*7*bglu*26 and *Os*3*bglu*7 constructs but no siRNA could be detected in the control transformed calli. The plantlet regeneration efficiencies at 5.5% and 3.1% were obtained from the calli transformed with the control and *Os12bglu38* contructs, respectively. All transformed plantlets contained the *npt*II gene from the T-DNA integration. Plantlets transformed with the control and *Os12bglu38* contructs did not show any differences in the phenotype.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ขอบเขตของการวิจัย	5
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	6
การทบทวนวรรณกรรม	7
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
ระเบียบวิธีวิจัย	18
บทที่ 3 ผลการวิจัย	
อภิปรายผล	30
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	61
บรรณานุกรม	64
ประวัติผู้วิจัย	67

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 คุณสมบัติ และตำแหน่งการแสดงออกของโปรตีนเบต้ากลูโคซิเดส GHI ที่ได้ทำนายไว้ 15

ตารางที่ 2 แสดงการไฮบริไดซ์ตัวอย่างข้าวที่ทำการเพาะปลูกในที่มีแสง และปลูกในที่ไม่มีแสง ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 21

ตารางที่ 3 ลำดับสารพันธุกรรมของไพรเมอร์ 23

ตารางที่ 4 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อไกลโคซิลไฮโดรเลสในชุดอะเรย์ข้าวขนาด 45K 32

ตารางที่ 5 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะต่อไกลโคซิลไฮโดรเลส ในชุดอะเรย์ข้าว ขนาด 45K ที่จัดจำแนกโดย Opassiri และคณะ (2006) 33

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ KDML105 บนอาหารเพาะเลี้ยง MS และ N6D และการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวโคชิฮิคาริด้วยอาหารเพาะเลี้ยง N6D 45

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพการงอกของแคลลัสที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะพาราโมไมซิน 58

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงกระบวนการอาร์เอ็นเอไอ ดัดแปลงมาจาก Dykxhoorn (2003) 10

รูปที่ 2 แผนผังรูปต้นไม้เปรียบเทียบโปรตีนไกลโคซิลไฮโดรเลสกลุ่มที่ 1 ในข้าวและพืชอื่น 14

รูปที่ 3 บริเวณที่ใช้สำหรับออกแบบไพรเมอร์ยับยั้งแต่ละยีน และทั้ง 5 ยีนเบต้ากลูโคซิเดส 22

รูปที่ 4 แผนที่เวคเตอร์ pHELLSGATE8 24

รูปที่ 5 เวคเตอร์ pENTR^{TM}/D-TOPO 25

รูปที่ 6 โครงสร้างของเอ็มอาร์เอ็นเอที่แสดงถึงส่วน UTRs ที่ไม่ถูกแปลรหัสไปเป็นโปรตีนด้วย 35

รูปที่ 7 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บนเจลอะกาโรสซึ่งใช้ปฏิกิริยา (PCR reacions) ของ *Os3bglu*7 35

รูปที่ 8 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแบคทีเรียที่คาดว่าได้รับพลาสมิด 36

รูปที่ 9 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรสหลังจากถูกตัดด้วยเอ็นไซม์จำเพาะ 37

รูปที่ 10 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของพลาสมิดบนเจลอะกาโรสหลังถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ที่จำเพาะ 38

รูปที่ 11 แถบดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรสที่วิเคราะห์หาชิ้นยีนเป้าหมายชิ้นที่ 2 ด้วยการตัดพลาสมิด ด้วยเอ็นไซม์จำเพาะ *Xba*I 39

รูปที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมายทั้ง 2 ชิ้น ที่แทรกอยู่ในเวคเตอร์ pHELLSGATE8 40

รูปที่ 13 แคลลัสปฐมภูมิของข้าวขาวดอกมะลิ KDML105 บนอาหารเพาะเลี้ยง N6D 41

รูปที่ 14 แคลลัสปฐมภูมิของข้าวโคชิฮิคาริ บนอาหารชักนำ N6D เป็นเวลา 2 สัปดาห์ 41

รูปที่ 15 แสดงการเจริญของแคลลัสจากแคลลัสปฐมภูมิ (A) จนกลายเป็นแคลลัสทุติยภูมิ (B) 41

รูปที่ 16 การชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวโคชิฮิคาริ (A) และข้าวขาวดอกมะลิ KDML105 (B) 42

รูปที่ 17 แคลลัสทุติยภูมิของข้าวโคชิฮิคาริ (A) และข้าวขาวดอกมะลิ KDML105 (B) 43

รูปที่ 18 แคลลัสทุติยภูมิของข้าวขาวดอกมะลิ KDML105 บนอาหาร MS (A) และ N6D (B) 45

รูปที่ 19 แคลลัสของเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ KDML105 ที่มีอายุการเก็บที่มากกว่า 6 เดือน 46

รูปที่ 20 แคลลัสของข้าวโคชิฮิคาริบนอาหารคัดเลือกหลังจากที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium* 47

รูปที่ 21 แสดงการพัฒนาจากแคลลัสจนเป็นต้นข้าว 49

รูปที่ 22 อาร์เอ็นเอที่สกัดได้ในแต่ละตัวอย่างแคลลัส 50

รูปที่ 23 ผลิตภัณฑ์อาร์ที-พีซีอาร์จากเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนเบต้ากลูโคซิเดสในแคลลัส ของชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os3bglu*8 51

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 24 ผลิตภัณฑ์อาร์ที-พีซีอาร์จากเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนเบต้ากลูโคซิเดสในแคลลัส ของชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os*7*bglu*26 52

รูปที่ 25 ผลิตภัณฑ์อาร์ที-พีซีอาร์จากเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนเบต้ากลูโคซิเดสในแคลลัส ของชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os*1*bglu*1 53

รูปที่ 26 ผลิตภัณฑ์อาร์ที-พีซีอาร์จากเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนเบต้ากลูโคซิเดสในแคลลัส ของชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os*3*bglu*7 54

รูปที่ 27 Northern blot analysis ของเอสไออาร์เอ็นเอ 57

รูปที่ 28 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *nptII* จากตัวอย่างต้นข้าวของชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os*12*bglu*38 60

รูปที่ 29 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *nptII* จากตัวอย่างต้นข้าวของชุดทดสอบควบคุม 60