วิภาภรณ์ วรรณธนาเลิศ : บทบาทหน้าที่ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสในข้าว (FUNCTIONAL GENOMIC OF RICE (*Oryza sativa* L.) β-GLUCOSIDASE) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มารินา เกตุทัต-คาร์นส์, 162 หน้า

การวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสจำนวนห้ายีน คือ *Os1bglu1 Os3bglu7 Os3bglu8 Os7bglu26* และ *Os12bglu38* ด้วยเทคนิค RNAi ในการทดลองนี้ได้แบ่งการยับยั้งการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดสเป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรกเป็นการยับยั้งการแสดงออกของเบต้ากลูโคซิเดสทั้งห้ายีนพร้อมกันโดยใช้ส่วนของ coding region ของ *Os3bglu7* มีความคล้ายกับยีนอื่นมากที่สุด กลุ่มที่สองเป็นการยับยั้งการแสดงออกของแต่ละยีนโดยใช้ส่วนของ 3'UTR ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงกับยีนเบต้ากลูโคซิเดสแต่ละตัว ยีนเป้าหมายถูกใส่เข้าไปในเวคเตอร์ pHELLSGATE8 และถูกส่งเข้าไปในแคลลัสของข้าวโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเพื่อสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ในข้าว

การชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหาร N6D เป็นระยะเวลา 4 ถึง 6 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และโคชิฮิคาริ ที่ 94.5 และ 93.4 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ แคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีขนาดเล็ก ผิวขรุขระ และเจริญเติบโตช้าเมื่อเปรียบเทียบกับโคชิฮิคาริ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของข้าว คือ การบ่มแคลลัสร่วมกับอะโกรแบคทีเรียมที่ความเข้มข้น OD_{600} เท่ากับ 0.02 ในอาหาร infection medium และซับแบคทีเรียส่วนเกินออกบนกระดาษปลอดเชื้อก่อนย้ายลงบนอาหาร co-cultivation (พีเอช 5.2) ที่เติม acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ และบ่มเป็นระยะเวลาสามวันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สารปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดอะโกรแบคทีเรียมและทำความเสียหายต่อแคลลัสน้อยที่สุดคือ timentin ที่ความเข้มข้น 300 มก./ล. การคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือก N6D ที่ใส่สารปฏิชีวนะ timentin และ paromomycin ที่ความเข้มข้น 300 และ 100 มก./ล. ตามลำดับ เป็นระยะเวลาสองเดือนพบว่าสามารถส่งถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของข้าวได้โดยพบแถบของดีเอนเอเป้าหมายของ *npt*II ในแคลลัสจากการทำการเพิ่มสายดีเอนเอด้วยปฏิกิริยา PCR แคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนเวคเตอร์ควบคุมที่ไม่มียีนแทรกอยู่มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนมากที่สุดที่ 19.7 เปอร์เซนต์ ส่วนแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนจากเวคเตอร์อื่นมีค่าอยู่ระหว่าง 15.3 ถึง 15.9 เปอร์เซนต์ แคลลัสกลุ่มที่หนึ่งซึ่งได้รับการถ่ายยีนที่ยับยั้งการแสดงออกของทั้งห้ายีนพร้อมกันพบว่ามีการปนเปื้อนของอะโกรแบคทีเรียมในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ทำให้แคลลัสไม่สามารถมีชีวิตรอดบนอาหารคัดเลือกได้ แคลลัสกลุ่มที่สองซึ่งได้รับการถ่ายยีนที่ยับยั้งการแสดงออกของแต่ละยีนบนอาหารคัดเลือก พบการปนเปื้อนของอะโกรแบคทีเรียมเพียงเล็กน้อยและไม่พบความแตกต่างทางสรีรวิทยา

ผลการตรวจสอบระดับการแสดงออกของ mRNA ในแคลลัสที่ผ่านการยับยั้งการแสดงออกของแต่ละยีน พบว่าไม่มีการแสดงออกของ mRNA ของยีนนั้น ๆ ในการยับยั้งยีน *Os1bglu1* *Os3bglu8* และ *Os7bglu26* แต่ในการยับยั้ง *Os3bglu7* ยังพบการแสดงออกของ mRNA ในระดับที่ต่างกันในแคลลัส ส่วน *Os12bglu38* นั้นปกติจะไม่พบการแสดงออกของ mRNA ในแคลลัส การตรวจสอบกระบวนการ RNAi ที่เกิดขึ้นในแคลลัส โดยใช้ Northern blot เพื่อตรวจหา siRNA พบว่า *Os1bglu1* *Os3bglu8* *Os7bglu26* และ *Os3bglu7* สามารถตรวจพบ siRNA ได้ในระดับที่แตกต่างกันแต่ไม่พบในแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยเวคเตอร์ควบคุม

การชักนำให้เกิดต้นของแคลลัสบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น พบว่าเฉพาะแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเวคเตอร์ควบคุมและ *Os12bglu38* สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 5.5 และ 3.1 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และพบแถบของดีเอนเอเป้าหมายของ *npt*II แต่ไม่พบความแตกต่างทางสรีระวิทยาระหว่างต้นข้าวที่ได้รับถ่ายยีนด้วยเวคเตอร์ควบคุมและ *Os12bglu38*

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2552 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

WIPAPORN WANTHANALERT : FUNCTIONAL GENOMIC OF RICE (*Oryza sativa* L.) β-GLUCOSIDASE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. MARIENA KETUDAT-CAIRNS, Ph.D., 162 PP.

β-GLUCOSIDASE/RICE/*AGROBACTERIUM*/RNA INTERFERENCE/TRANSFORMATION

This research attempted to study the function of 5 β-glucosidase genes (*Os1bglu1*, *Os3bglu7*, *Os3bglu8*, *Os7bglu26* and *Os12bglu38*) by RNAi technique. The suppression of β-glucosidase genes was divided into 2 parts. In the first part, 5 β-glucosidase genes were knocked down with one construct containing a highly conserved coding region that matched all 5 genes which were based on the *Os3bglu7* sequence. In the second part, individual β-glucosidase genes were knocked down with 3'UTR sequences of each gene. The target genes fragments were cloned into the pHELLSGATE8 vector, then transferred into rice calli via *Agrobacterium* to produce dsRNA in rice.

High percentages of effective callus induction of 94.5% and 93.4%, respectively, were obtained when seeds of rice cv. KDML105 and Koshihikari were cultured on N6D medium for 4-6 weeks at 28^{o}C. KDML105 calli were small, with rough surfaces and their growth rate was slower than Koshihikari. The suitable conditions for rice transformation were incubation of the calli with *Agrobacterium* (OD_{600} = 0.02) in infection medium and blotted dry on sterile tissue paper to remove excess bacteria cells, then transferred to co-cultivation media (pH 5.2) with 200 μM acetosyringone and incubated for 3 days at 25^{o}C. Timentin at 300 mg/L was able to eliminate *Agrobacterium* with little damage to the calli. The calli were grown on N6D selection medium supplemented with 300 mg/L timentin and 100 mg/L paromomycin

for 2 months, 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%. However, the transformation of knock down 5 genes construct into the calli of KDML105 and Koshihikari were contaminated with *Agrobacterium* and all calli died after being transferred onto a selection medium. The knock down individual genes in calli had low *Agrobacterium* contamination and did not show any different phenotypes when compared to the control calli.

Expression of *Os1bglu1*, *Os3bglu8* and *Os7bglu26* mRNA was not found in calli transformed with their respective knock down constructs. However, *Os3bglu7* still shows mRNA expression at different levels after transformation with its knock down construct. The mRNA expression of *Os12bglu38* was not found in a 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 *Os1bglu1*, *Os3bglu8*, *Os7bglu26* and *Os3bglu7* 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.

School of Biotechnology Student's Signature_____

Academic Year 2009 Advisor's Signature_____