แดง ทิ แทน ตั้ม : การศึกษาบทบาทและหน้าที่ของยีนบีตากลูโคสิเดสในข้าวโดยเทคนิค RNAi (STUDYING THE GENETIC FUNCTION OF RICE β-GLUCOSIDASE VIA RNA INTERFERENCE) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มารินา เกตุทัต-คาร์นส์, 89 หน้า.

การแสดงออกของยีน *Os3bglu7* และยีนบีตากลูโคสิเดสอีกสี่ยีนในข้าว ถูกยับยั้งการ (knocked down) โดยใช้พลาสมิด pOpOff2 ที่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RNAi เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสาร dexamethasone (DEX) พลาสมิด pOpOff2/Bglu7 ซึ่งมีลำดับยีนเป้าหมายจำเพาะกับ 3'UTR ของยีน *Os3bglu7* ถูกสร้างเพื่อใช้ในการยับยั้งแสดงออกของยีน *Os3bglu7* และพลาสมิด pOpOff2/Kn5 ถูกออกแบบเพื่อ ยับยั้งการแสดงออกของกลุ่มยีนบีตากลูโคสิเดสจำนวน 5 ยีน โดยใช้ลำดับนิวคลีโทด์ที่จำเพาะต่อยีน *Os3bglu7* โดยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA105 ถูกนำมาใช้เพื่อถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว อีกทั้งรีคอมบิแนนท์บีตากลูโคสิเดส (rOs3BGlu7) และ/หรือ DEX ถูกนำมาเติมในขบวนการถ่ายยีน เพื่อศึกษาบทบาทและหน้าที่ของยีนบีตากลูโคสิเดสในข้าว จากผลการทดลองพบว่า แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม DEX และ rOs3BGlu7 (กลุ่มควบคุม) มีจำนวนแคลลัสที่ตายน้อยกว่าแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติม DEX และ rBGlu7 นอกจากนี้ การเติม DEX เพื่อ ยับยั้งการแสดงออกของกลุ่มยีนบีตากลูโคสิเดสทั้ง 5 ยีน ส่งผลให้ปริมาณเชื้อ อะโกรแบคทีเรียที่ปนเปื้อนบนผิวของแคลลัสเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สำหรับการยับยั้งการแสดงออกของยีน *Os3bglu7* พบว่าการเติม DEX และ rOs3BGlu7 ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

นอกจากนี้ยังศึกษา การงอกและการพัฒนาของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม โดยหลังจากเติม DEX เพื่อ ยับยั้งการแสดงออกของยีนบีตากลูโคสิเดสทั้ง 5 พบว่ามีผลต่อการงอกของเมล็ด และการยืดยาวของยอด และราก จากนั้นนำยอดของต้นข้าวดังกล่าวมาทำการตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนบีตากลูโคสิเดสทั้ง 5 ด้วย real-time PCR ซึ่งพบว่า ยีนดังกล่าวถูกยับยั้งการแสดงออกหลังจากเติม DEX จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การแสดงออกของกลุ่มยีนบีตากลูโคสิเดสอาจจะมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญของต้นอ่อน อย่างไรก็ตามเมื่อเติม DEX ที่ความเข้มข้น 150 μM พบว่ามีผลในทางลบต่อการงอกของรากทั้งในข้าวดัดแปลงพันธุกรรม และข้าวปกติ โปรโมเตอร์

pOp6 ที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่เหมาะสมกับการแสดงออกในข้าว เพราะการย้อม GUS พบว่า GUS ไม่ได้มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อทุกส่วน

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อนักศึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

DANG THI THANH TAM : STUDYING THE GENETIC FUNCTION OF RICE β-GLUCOSIDASE VIA RNA INTERFERENCE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. MARIENA KETUDAT-CAIRNS, Ph.D., 89 PP.

β-GLUCOSIDASE/ DEXAMETHASONE/ RNA INTERFERENCE/ *AGROBACTERIUM* TRANSFORMATION.

The highly expressed *Os3bglu7* and four other rice β-glucosidase genes were knocked down via a high-throughput dexamethasone (DEX) induced RNAi vector, pOpOff2. In the first construct (pOpOff2/Bglu7), the highly expressed *Os3bglu7* was knocked down with a construct that contains the target specific 3'UTR sequence. The second construct, pOpOff/Kn5, was designed to knock down a group of five closely related rice β-glucosidase genes. In this construct, the target sequence was amplified from the coding region of *Os3bglu7*. The rice transformation was done with *Agrobacterium* strain EHA105. Recombinant β-glucosidase protein (rOs3BGlu7) and/or DEX were added in the transformation processes. The results show that control treatment (no dexamethasone, no recombinant β-glucosidase protein added) had a lower number of dead calli indicating higher efficiency of transformation on selection medium than the treatments that applied DEX and supplemented with recombinant protein in both constructs. Moreover, adding DEX to knock down the five β-glucosidase genes increased the *Agrobacterium* population on the surface of the calli when compared to the control. No effects on the *Agrobacterium* population were observed for addition of DEX to knock down *Os3bglu7* and the supplementation with rOs3BGlu7.

Furthermore, when DEX was added to knock down the β-glucosidase genes' expression in germination and in the development of transgenic plantlets, the knocking down of these genes suppressed the germination of transgenic rice seed and the elongation of the shoot. The expression of these five β-glucosidase genes in shoots were measured by real-time PCR, which showed that they were partially knocked down after DEX treatment. These data indicated that these β-glucosidase genes may play important roles in the development of plantlet shoot. However, the effect of high concentration of DEX (150 μM) was observed on the development of root in both wild type and transgenic rice. The pOp6 promoter is not strong in rice, since GUS staining did not express in every tissue.

School of Biotechnology

Academic Year 2010

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____