


การส่งถ่ายและการแสดงออกของยีนที่ผลิตโปรตีนเหนียวนาภายใต้ภาวะความเครียด , *hva1* ,
จากต้นอ่อนของข้าวบาร์เลย์ในข้าวขาวดอกมะลิ *Oryza sativa* cv. KDML105



นางสาวกัลยาณี สามิภักดิ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี

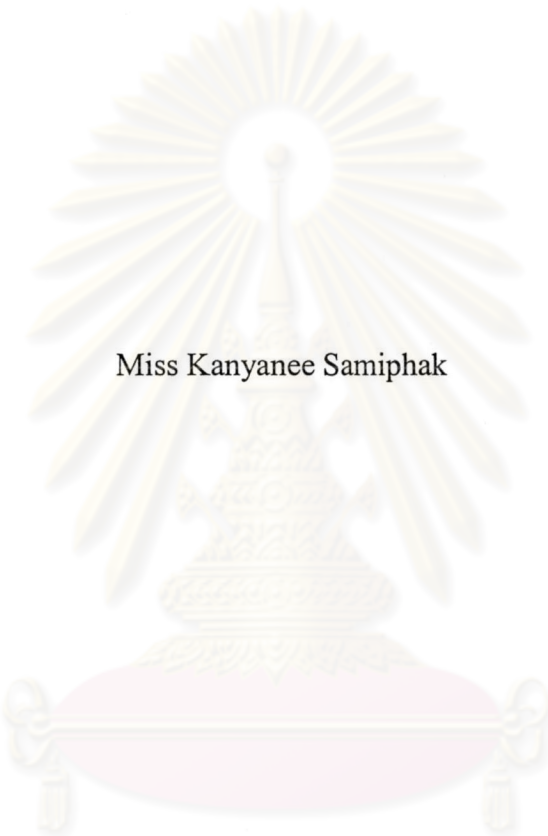
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-2905-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TRANSFORMATION AND EXPRESSION OF BARLEY STRESS-INDUCED
EMBRYOGENIC *hva1* GENE IN *Oryza sativa* cv. KDML 105



Miss Kanyanee Samiphak

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Science

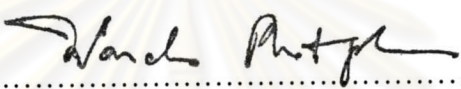
Chulalongkorn University

Academic Year 2002

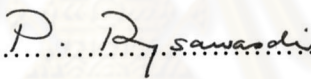
ISBN 974-17-2905-7

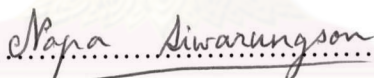
Thesis Title Transformation and expression of barley stress-induced embryogenic *hva1* gene in *Oryza sativa* cv. KDML 105
By Kanyanee Samiphak
Field of study Biochemistry
Thesis Advisor Associate Professor Napa Siwarungson, M.Sc.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree

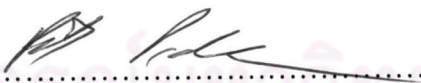

..... Dean of Faculty of Science
(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

Thesis Committee


..... Chairman
(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)


..... Thesis Advisor
(Associate Professor Napa Siwarungson, M.Sc.)


..... Member
(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)


..... Member
(Rath Pichyangkura, Ph.D.)

กัลยาณี สามีภักดี : การส่งถ่ายและการแสดงออกของยีนที่ผลิตโปรตีนเหนียวนำภายใต้ภาวะ
ความเครียด *hva1* จากต้นอ่อนของข้าวบาร์เลย์ในข้าวขาวดอกมะลิ *Oryza sativa* cv. KDML 105
(TRANSFORMATION AND EXPRESSION OF BARLEY STRESS-INDUCED EMBRYOGENIC
hva 1 GENE IN *Oryza sativa* cv. KDML 105) อ.ที่ปรึกษา : รศ. นภา ศิวรังสรรค์, 113 หน้า, ISBN
974-17-2905-7.

ยีนที่สร้างโปรตีนกรีนฟลูออเรสเซนต์ (GFP) และยีนที่ผลิตโปรตีนเหนียวนำภายใต้ภาวะความเครียด ถูกส่งถ่าย
เข้าสู่ข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยอาศัยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย การส่งถ่ายยีนกระทำโดยการเลี้ยงเอมบริโอเจนิคเซลล์ที่ได้
จากสควิลล์ของเอมบริโอร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ *A. tumefaciens* EHA105 ซึ่งมี pCAMBIA5305hpt-
vector (ภายในมียีนที่สร้างกรีนฟลูออเรสเซนต์เป็นยีนติดตาม) , เวกเตอร์ pCAMBIA5305 (ภายในมียีนเครื่องหมาย *hpt*
และยีนติดตามกรีนฟลูออเรสเซนต์) และเวกเตอร์ pCAMBIA 5305*hva1* (ภายในมียีนเครื่องหมาย *bar* , ยีนติดตาม
กรีนฟลูออเรสเซนต์โปรตีน และยีนที่ผลิตโปรตีนเหนียวนำภายใต้ภาวะความเครียด *hva1*)

โดยในการทดลองที่ 1 เอมบริโอเจนิคเซลล์ได้รับการส่งถ่ายยีนโดยอาศัยเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่มี
pCAMBIA5305hpt- vector เอมบริโอเจนิคเซลล์ถูกเลี้ยงร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อในอาหารที่
ปราศจากสารคัดเลือก หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 1 และ 10 วัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การทรานส์ฟอร์มของเซลล์ที่มีการแสดง
ออกของยีนที่สร้างกรีนฟลูออเรสเซนต์ เป็น 8 และ 15 % ตามลำดับ และพบว่าไม่สามารถตรวจพบเซลล์ที่สร้าง
กรีนฟลูออเรสเซนต์โปรตีนได้หากเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เซลล์ที่ผลิตโปรตีนกรีนฟลูออเรสเซนต์ทั้งหมดถูกนำมา
ทดลองต่อโดยการตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และนำไปเพาะบนอาหารเร่งการเจริญเป็นยอดพบว่า เซลล์ที่ถูกตัดทั้งหมดไม่
สามารถเจริญต่อไปได้ ในการทดลองที่ 2 เชื้ออะโกรแบคทีเรียที่มี pCAMBIA5305 ถูกใช้ส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ โดย
ทดลอง 2 ช่วงเวลา คือ การส่งถ่ายยีนนาน 10 และ 15 นาที ร่วมกับการเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 2 วัน และ 3 วัน ตามลำดับ
หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การทรานส์ฟอร์มของเซลล์ที่สามารถเจริญในไฮโกรไมซินได้และมี
การแสดงออกของยีนที่สร้าง GFP เป็น 10 และ 16 % ตามลำดับ เซลล์ที่ได้รับการทรานส์ฟอร์มกรีนฟลูออเรสเซนต์จะ
ถูกชักนำให้เกิดต้นใหม่ ภายหลังจากเพาะเลี้ยงพบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างต้นควบคุมและต้นที่ได้รับการส่งถ่ายยีน
ประสิทธิภาพของการทรานส์ฟอร์มอะโกรแบคทีเรียเข้าสู่ต้นข้าวที่มีการแสดงออกของ GFP มีค่าอยู่ในช่วง 4-5.5% และ
เมื่อทดสอบในรุ่นถัดไปพบว่ายังคงมีการแสดงออกของกรีนฟลูออเรสเซนต์โปรตีน ในการทดลองที่ 3 เอมบริโอเจนิค
เซลล์ได้รับการส่งถ่ายยีนโดยอาศัยเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่มี pCAMBIA5305*hva1* เซลล์ถูกเลี้ยงร่วมกับเชื้อเป็นเวลา
3 วัน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย glufosinate ความเข้มข้น 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เปอร์เซ็นต์
การทรานส์ฟอร์มเซลล์ที่สามารถเจริญได้บนอาหารที่เติม glufosinate และมีการแสดงออกของรีพอร์เตอร์ยีนที่สร้าง
GFP เป็น 1.8, 2.7 และ 2.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ทั้ง 3 ความเข้มข้น พบเซลล์ที่มีการแสดงออกกรีนฟลูออเรสเซนต์
ทั้งหมด 12 ก้อน มีเพียง 1 ก้อนจากการเลี้ยงบนอาหารที่เติม glufosinate 8 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร
ที่สามารถเจริญเป็นต้นได้ โดยต้นที่ได้จากเซลล์ที่เลี้ยงบน glufosinate 8 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเจริญได้เป็นปกติ
ในขณะที่ต้นที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ต้นเหี่ยว ประสิทธิภาพของการทรานส์ฟอร์มของอะโกร
แบคทีเรียเข้าสู่ต้นข้าวที่มีการแสดงออกของกรีนฟลูออเรสเซนต์โปรตีนและยีน *hva1* ในระดับ mRNA เมื่อเลี้ยงในอาหาร
ที่เติม glufosinate 8 มิลลิกรัมต่อลิตรมีค่า 0.54%

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต..... กัลยาณี สามีภักดี
สาขาวิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... รศ. นภา ศิวรังสรรค์
ปีการศึกษา.....2545.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4272211223 : MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD : AGROBACTERIUM / TRANSFORMATION / KDML105 / GFP / LEA / *hva1*

KANYANEE SAMIPHAK : TRANSFORMATION AND EXPRESSION OF BARLEY STRESS-INDUCED EMBRYOGENIC *hva1* GENE IN *Oryza sativa* cv. KDML105. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. NAPA SIWARUNGSON, 113 PP. ISBN 974 -17-2905-7.

Agrobacterium-mediated transformation was used to transfer green fluorescent protein (GFP) and *hva1* gene into *indica* rice variety (*Oryza sativa* cv. KDML105). Embryogenic calli derived from scutellum of mature embryo were co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA 105 carrying pCAMBIA5305 *hpt*-vector (GFP as the reporter gene), pCAMBIA 5305 (*hpt* as a selectable marker gene and GFP as the reporter gene) and pCAMBIA5305 *hvaI* (*bar* as a selectable marker gene, GFP as reporter gene and *hva1*).

In first study, embryogenic calli were infected with *A. tumefaciens* carrying pCAMBIA5305 *hpt*-vector. The embryogenic calli were co-cultivated for 3 days and transferred to induction medium without selective agent. After 1 day and 10 days of co-cultivation, the efficiency of transformation calli was 8 and 15%, respectively. Four weeks of selection, the infected embryogenic calli failed to detect. Total of GFP positive calli were cut into small pieces and transferred to regenerated medium. The section calli did not show continuous growth. In second study, *A. tumefaciens* strain EHA 105 harbouring pCAMBIA 5305 was used for co-cultivation of embryogenic calli. Condition of infection was varied to 10 minutes infected/ 2 days co-cultivated and 15 minutes infected / 3 days co-cultivated. After 8 weeks on selection with hygromycin, the efficiency of transformation of calli upon hygromycin resistance and GFP expression was 10 and 16 % to observe from 2 and 3 days co-cultivated calli , respectively. Transgenic rice plants were regenerated from visually selected GFP-positive calli. No difference were observed in the morphology between transformed and non-transformed plants. The frequency of transformation, based upon GFP fluorescence and PCR analysis, was ranged from 4 to 5.5%. Expression of GFP and its inheritance was stable in T₁ progeny. In third study, the embryogenic calli were co-cultivated with *A. tumefaciens* EHA 105 (pCAMBIA5305*hva1*). The embryogenic calli were co-cultivated for 3 days. Concentrations of selection medium were varied to 6, 8 and 10 mg/l glufosinate. The efficiency of transformed calli upon resistance to glufosinate and GFP expression were 1.8, 2.7 and 2.2 %, respectively. Of the 12 callus lines produced from three concentrations, one line from each 8 and 10 mg/l glufosinate selection gave rise to plants. One line from 8 mg/l glufosinate had normal morphology. Another line from 10 mg/l glufosinate gave rise to albino plants. The frequency transformation of plant upon GFP expression and *hva1* (level mRNA), which selected on 8 mg/l glufosinate, was 0.54%.

Department/Program.....Biochemistry.....Student's signature.....Kanyanee Samiphak.....
 Field of study.....Biochemistry.....Advisor's signature.....Napa Siwarungson.....
 Academic year.....2002.....Co-advisor's signature.....-

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to expressy deepest sense of gratitude to my advisor, Assoc. Prof. Napa Siwarungson for her guidances, encouragement, valuable suggestion and supports throughout my study.

My appreciation is also expressed to Assoc. Prof. Dr. Piamsook Pongsawasdi, Assoc. Prof. Dr. Siriporn Sittipraneed and Dr. Rath Pichyangkura for their valuable recommendations and suggestions.

I am very thankful to Dr. Ray Wu Department of Molecular Biology & Genetic, Cornell University, New York for their help in supporting the plasmid DNA, and recommendations.

I would also like to thank all of my friends in my laboratory R707,R708 and R709 for their friendly assistance as well.

My sincere thanks are also expressed to Miss Chanprapa Imjongjirak and Miss Kamontip Kuttiyawong for his friendship and encouragement throughout my study.

Finally, I would like to express my deepest appreciation to my parents , my sisters and my brothers for their love, care, understanding and encouragement extended throughout my study.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xi
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiii
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
1.1 LEA protein.....	2
1.2 The <i>HVA1</i> gene.....	4
1.3 Rice transformation.....	5
1.4 <i>Agrobacterium</i> -mediated transfer of foreign genes into target plants.....	6
1.5 Rice transformation using <i>Agrobacterium</i>	9
1.6 Selectable Marker Genes.....	10
1.7 Hygromycin phosphotransferase gene.....	10
1.8 Bialaphos Resistance Gene (<i>bar</i>).....	10
1.9 Reporter gene in plants.....	11
1.10 Green Fluorescent Protein (GFP).....	11
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS.....	16
2.1 Equipments and reagents.....	16
2.2 Preparation of pCAMBIA5305 <i>hva1</i>	19
2.3 Production of embryogenic calli from mature embryos.....	24
2.4 Transformation of binary vectors to embryogenic calli by co-cultivation with <i>Agrobacterium</i>	25
2.5 Selection and regeneration of transformed calli.....	26
2.6 Detection of GFP expression.....	27
2.7 Analysis of GFP, <i>nptII</i> and <i>hva1</i> gene in total DNA of transformed rice.....	27

2.8 RNA analysis.....	30
CHAPTER III RESULT.....	32
Part I Transformation of GFP into <i>O. sativa</i> KDML105 without selection pressure	
3.1.1 Detection of deleted hygromycin pCAMBIA5305 <i>hpt</i> -vector.....	32
3.1.2 Co-cultivation of rice calli with <i>A. tumefaciens</i> EHA105 (pCAMBIA5305 <i>hpt</i> -vector).....	34
Part II Detection of stable GFP expression and inheritance in T1 progeny	
3.2.1 Co-cultivate of rice calli with <i>A. tumefaciens</i> EHA105 (pCAMBIA5305).....	38
3.2.2 Regeneration of putative GFP transformed calli.....	42
3.2.3 Expression of GFP in primary transformed rice plants.....	45
3.2.4 PCR analysis of putative transformants.....	48
3.2.5 Progeny analysis.....	50
Part III Transformation of <i>hva</i> 1 in <i>O. sativa</i> KDML105	
3.3.1 Detection of pCAMBIA5305 <i>hva</i> 1.....	61
3.3.2 Co-cultivate of rice calli with <i>A. tumefaciens</i> (pCAMBIA5305 <i>hva</i> 1).....	63
3.3.3 Investigation the role of LEA3 accumulation in <i>Oryza sativa</i> KDML105.....	63
3.3.4 Regeneration of transformed calli.....	64
3.3.5 PCR analysis of <i>hva</i> 1 transformed rice plants.....	71
3.3.6 Expression of <i>hva</i> 1 gene and GFP gene.....	73
CHAPTER IV DISCUSSION.....	77
CHAPTER V CONCLUSION.....	83
REFERENCES.....	84
APPENDICES.....	91
Appendix A.....	92
Appendix B.....	100
Appendix C.....	103
Appendix D.....	108
Appendix E.....	112

Biography.....113



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Tables	Page
Table 2.1	Sequences of the primers used for PCR amplification of DNA Fragments coding for sGFP gene, <i>nptII</i> and <i>hva1</i> gene.....30
Table 3.1	Expression of GFP in rice callus after co-cultivation with pCAMBIA5305 <i>hpt</i> -vector for 3 days.....36
Table 3.2	Efficiency of rice transformation by <i>A. tumefaciens</i> EHA105 (pCAMBIA5305)[10 min infection time, 2 days co-cultivation].....39
Table 3.3	Efficiency of rice transformation by <i>A. tumefaciens</i> EHA105 (pCAMBIA5305)[15 min infection time, 3 days co-cultivation].....39
Table 3.4	Germination of seed.....51
Table 3.5	Non-germination of seed.....52
Table 3.6	GFP-positive germinated seed.....53
Table 3.7	GFP positive plants of each line compared to control.....54
Table 3.8	Expression of GFP in rice callus after co-cultivation with pCAMBIA5305 <i>hva1</i>65
Table 3.9	Efficiency of rice transformation by <i>A. tumefaciens</i> EHA105 (pCAMBIA5305 <i>hva1</i>).....65

LIST OF FIGURES

Figures	Page
Figure 1.1 Basic steps in the transformation of plant cells by <i>A. tumefaciens</i> (Zupan and Zambryski, 1995).....	7
Figure 1.2 The overall shape of the green fluorescent protein and its association into dimer.....	13
Figure 1.3 Steps in the formation of the chromophore.....	14
Figure 3.1 Characterization of 9.3 kb linearized fragment of pCAMBIA5305 <i>hpt</i> -vector.....	33
Figure 3.2 GFP-positive spot on transgenic callus after 10 days co-cultivation.....	37
Figure 3.3 Proliferation of the infected callus under hygromycin selection (50 mg/l). Rice embryogenic callus transformation mediated by <i>A. tumefaciens</i> EHA105(pCAMBIA5305).....	40
Figure 3.4 GFP as a vital screenable marker in rice transformation using <i>A. tumefaciens</i> EHA105(pCAMBIA5305).....	41
Figure 3.5 Regeneration of transformants.....	43
Figure 3.6 GFP expression in primary transformants.....	44
Figure 3.7 Cross-section of root under fluorescent microscope.....	46
Figure 3.8 Cross-section of older leaves after 2 months in field.....	47
Figure 3.9 PCR analysis of the GFP in putative transformed rice plants co-cultivated with <i>A. tumefaciens</i> EHA105 (pCAMBIA5305) for 3 days.....	49
Figure 3.10 T ₀ plants were grown in pot.....	55
Figure 3.11 Comparison of non-transformed rice (left) and transgenic rice (right) after 3 months in pot.....	56
Figure 3.12 Control T ₀ plants set seeds in pot.....	57
Figure 3.13 Transgenic T ₀ plants set seeds in pot.....	57
Figure 3.14 Transgenic T ₀ plants failed to set seeds.....	57

Figure 3.15 Expression of GFP in young flower observed under fluorescence microscope.....	58
Figure 3.16 GFP expression in T ₁ transformants observed under fluorescent microscope.....	59
Figure 3.17 PCR analysis of the GFP in T ₁ transformed rice plants co-cultivated with <i>A. tumefaciens</i> EHA105 (pCAMBIA5305).....	60
Figure 3.18 A restriction pattern of <i>Xho</i> I / <i>Eco</i> RI digested pCAMBIA5305, pBY520 and pCAMBIA5305 <i>hva</i> 1.....	62
Figure 3.19 Proliferation of the infected callus under the second glufosinate selection (8 mg/l glufosinate). Rice embryogenic callus transformation mediated by <i>A. tumefaciens</i> EHA105 (pCAMBIA5305 <i>hva</i> 1).....	66
Figure 3.20 GFP as a vatal screenable marker in rice transformation using <i>A. tumefaciens</i> EH105 (pCAMBIA5305).....	67
Figure 3.21 Embryogenic callus produced green spots after 3 weeks on regeneration medium supplemented with 6 mg/l glufosinate.....	68
Figure 3.22 Comparison of regenerated non-transformed rice (left) and regenerated transgenic rice (right) after transfer to rooting medium at 6 mg/l glufosinate for 3 weeks.....	69
Figure 3.23 Embyogenic callus produced albino shoot after 3 weeks on regeneration medium supplemented with 3 mg/l glufosinate.....	70
Figure 3.24 PCR analysis of the GFP in putative transformed rice plants co-cultivated with <i>A. tumefaciens</i> EHA105(pCAMBIA5305 <i>hva</i> 1).....	72
Figure 3.25 RT-PCR analysis of the expression of <i>hva</i> 1 in transgenic lines.....	74
Figure 3.26 RT-PCR analysis of the expression of GFP in transgenic lines.....	75
Figure 3.27 Detection of GFP in the leaves of transgenic rice plant (8 mg/l glufosinate selection) 6 weeks after regeneration.....	76

LIST OF ABBREVIATIONS

ABA	=	abscisic acid
ATP	=	adenosine triphosphate
bp	=	base pair
°C	=	degree celcius
CTAB	=	cetyltrimethylammonium bromide
CAT	=	chloramphenicol
dATP	=	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	=	deoxycytosine triphosphate
dGTP	=	deoxyguanosine triphosphate
dTTP	=	deoxythymine triphosphate
DNA	=	deoxyribonucleic acid
FITC	=	fluorescein isothiocyanate
GFP	=	green fluorescent protein
GlufosinateR	=	glufosinate resistance
GUS	=	β-glucuronidase
ha	=	hectar
HCl	=	hydrochloric acid
<i>hpt</i>	=	hygromycin phosphotransferase gene
HygR	=	hygromycin resistance
IPTG	=	isopropyl-thiogalactoside
Kb	=	kilobase
KCl	=	potassium chloride
LEA	=	Late embryogenic abundant protein
MgCl ₂	=	magnesium chloride
mg	=	milligram
ml	=	millilitre
mm	=	millimetre
M	=	molar
ng	=	nanogram
<i>nptII</i>	=	neomycin phosphotransferase gene
OD	=	optical density

PCR	=	polymerase chain reaction
PEG	=	polyethylene glycol
RNaseA	=	ribonuclease A
rpm	=	revolution per minute
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
sGFP	=	synthetic green fluorescent protein
Tris	=	tris (hydroxymethyl) aminomethane
μg	=	microgram
μl	=	microlitre
μM	=	micromolar
U	=	unit
UV	=	ultraviolet
vir	=	virulence
X-Gluc	=	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย