การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในข้าว *Oryza sativa* L. พันธุ์เหลืองประทิว123 สายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์ทนเค็มในภาวะเค็ม

นางสาวสมพร มณีประสพสุข

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

!SBN 947-17-6548-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COMPARISON OF GENE EXPRESSION BETWEEN THE ORIGINAL RICE *Oryza sativa* L. cv. LEUNG PRATEW 123 AND THE SALT-TOLERANT LINES IN SALT-STRESSED CONDITION

Miss Somporn Maneeprasobsuk

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fullfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Genetics
Department of Botany
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2004

ISBN 974-17-6548-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในข้าว *Oryza sativa* L. พันธุ์เหลืองประทิว123 สายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์ทนเค็มในภาวะเค็ม
โดย	นางสาวสมพร มณีประสพสุข
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. เอกพันธ์ บางยี่ขัน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณะบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันทน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ ดร. เอกพันธ์ บางยี่ขัน)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ กิตติคุณ มนทกานติ วัชราภัย)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สมพร มณีประสพสุข: การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในข้าว *Oryza sativa* L. พันธุ์เหลืองประทิว123 สายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์ทนเค็มในภาวะเค็ม (COMPARISON OF GENE EXPRESSION BETWEEN THE ORIGINAL RICE *Oryza sativa* L. cv. LEUNG PRATEW 123 AND THE SALT-TOLERANT LINES IN SALT-STRESSED CONDITION) อาจารย์ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: อ. ดร. เอกพันธ์ บางยี่ขัน. 92 หน้า. ISBN 974-17-6548-7

การแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อใบข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์เหลืองประทิว123 สายพันธุ์เดิม (LPT123) และสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) อายุ 2 สัปดาห์ ที่เจริญในภาวะปกติ และได้รับโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่เปรียบเทียบด้วยวิธี differential display โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่เป็น poly T oligonucleotide primer จำนวน 8 ชนิด และไพรเมอร์สุ่มจำนวน 20 ชนิด พบแถบ cDNA แตกต่างกันจำนวน 108 แถบ ซึ่งชิ้นส่วน cDNA จำนวน 36 ชิ้น ถูกโคลน และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ Blast algorithm ของ EMBL โดยในจำนวนนี้มี cDNA จำนวน 27 โคลน ที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสร้างโปรตีนที่รู้หน้าที่แล้ว ในขณะที่โคลนอีก 9 โคลน มีความคล้ายคลึงกับยีนสร้างโปรตีนที่ยังไม่มีการศึกษาหน้าที่ สำหรับการทำ northern blot analysis โดยใช้ cDNA จำนวน 8 โคลน ซึ่งมี derived amino acid sequence คล้ายคลึงกับโปรตีนของข้าวมากที่สุด และอีก 1 โคลน ที่มีความคล้ายคลึงกับยีนสร้างโปรตีนของ *Klebsiella aerogenes* มาทำเป็น probe พบว่ามีเพียง 4 โคลน คือ OsD1B16-1, OsD1B15-5, OsD1B18-18 และ OsD2B15-2 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ RIM2 protein putative 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2, 6-bisphosphate 2-phosphatase hypothetical protein และ NAD(P) H-quinone oxidoreductase ตามลำดับ ที่สามารถจับกับ total RNA ที่สกัดจากข้าวได้ ซึ่งการชักนำการแสดงออกของยีนเหล่านี้พบ หลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยคาดว่ายีนดังกล่าวอาจมีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนเค็ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต.....สมพร มณีประสพสุข.....

สาขาวิชา.....พันธุศาสตร์.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....ศุภจิตรา ชัชวาลย์.....

ปีการศึกษา.....2547.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4572624023 : MAJOR GENETICS

KEY WORDS : RICE/ *Oryza sativa* L./ GENE EXPRESSION/ DIFFERENTIAL DISPLAY/ SALT STRESS

SOMPORN MANEEPRASOBSUK : COMPARISON OF GENE EXPRESSION BETWEEN THE ORIGINAL RICE *Oryza sativa* L. cv. LEUNG PRATEW 123 AND THE SALT-TOLERANT LINES IN SALT-STRESSED CONDITION , THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. DR. SUPACHITRA CHADCHAWAN, THESIS COADVISOR: DR. EAKAPHUN BANGYEEKHUN, 92 pp. ISBN 947-17-6548-7

The foliar gene expression of 2 week-old rice (*Oryza sativa* L.) cv. Leung Pratew 123, the original cultivar (LPT123) and the salt-tolerant line (LPT123-TC171), grown in the normal condition and treated with 0.5% (w/v) NaCl for 48 hours was compared using the differential display method. Reverse-transcription polymerase chain reaction using combination of 8 poly T oligonucleotide and 20 arbitary primers showed 108 different cDNA bands. Thirty-six cDNA fragments were cloned and sequence analysis was performed using Blast algorithm of EMBL. Twenty-seven of them were similar to the nucleotide sequences encoding with known function proteins whereas the others showed the homology with the uncharacterized proteins. For northern blot analysis, 8 cDNA clones whose derived amino acid sequences showing the highest similarity to the rice proteins and one cDNA clone whose derived amino acid sequence was similar to protein of *Klebsiella aerogenes* were used as probes. Only four clones, OsD1B16-11, OsD1B15-5, OsD1B18-18 and OsD2B15-2, that had the similarity with RIM2 protein, putative 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2, 6-bisphosphate 2-phosphatase, hypothetical protein, and NAD(P) H-quinone oxidoreductase, respectively, could hybridize with total RNA extracted from rice seedlings. The salt-stress induction of these genes was detected after 48 hours of the salt treatment. Possibly, these genes were related to salt-tolerance of the plant.

Department.....Botany..... Student's Signature.....Somporn Maneeprasobsuk.....

Field of study.....Genetics.....Advisor's Signature.....Supachitra Chadchawan.....

Academic year....2004.....Co-advisor's Signature .....Eakaphun Bangyeekhun.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำต่างๆ ตลอดการทำวิจัยและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.เอกพันธ์ บางยี่ขัน อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันทน์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ กิตติคุณ มนทกานติ วัชราภัย และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือต่างๆ ตลอดการทำวิจัยและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ต่อศักดิ์ สีลานันท์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือทางด้านอุปกรณ์การทำวิจัย และให้คำแนะนำต่างๆ ตลอดการทำวิจัย

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์ และกลุ่มวิทยานิพนธ์ เพื่อการตีพิมพ์เผยแพร่ ในระดับบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนการศึกษาและวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณฐปนา บางยี่ขัน คุณสหัช จันทนาอรพินท์ สำหรับความช่วยเหลือในการทำวิจัย คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ รวมทั้งกำลังใจและความห่วงใย

ขอขอบคุณ คุณปารวี ธิกาศ คุณศักดิ์ชัย กรรมารางกูร คุณธัญญารัตน์ คงขุนเทียน คุณมะลิวรรณ นาคขุนทด คุณชัชวาล วงค์ชัย คุณสุภาลัย ไชยสุต คุณพงศธร กล่อมสกุล และทุกท่านในภาควิชา พฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่สนับสนุนในด้านการเรียนตลอดจนเป็นกำลังใจให้เสมอมา จนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญรูปภาพ..... ญ

บทที่

1. บทนำ..... 1
2. การตรวจเอกสาร..... 4
   - ผลกระทบจากภาวะเค็มที่มีต่อพืช..... 4
   - การปรับตัวเมื่อได้รับภาวะเค็มของพืช..... 5
   - differential display..... 8
   - เทคนิค differential display กับการศึกษาการแสดงออกของยีนในภาวะเค็ม..... 11
3. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง..... 13
   - พืชทดลอง..... 13
   - สถานที่ปลูกพืชทดลอง..... 13
   - อุปกรณ์การศึกษา..... 13
   - วิธีการทดลอง..... 22
4. ผลการทดลอง..... 27
   1. การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค differential display 27
   2. การโคลนชิ้นส่วน DNA ที่แตกต่างกัน..... 31
   3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนDNA..... 46
   4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่โคลนได้ด้วย northern blot analysis... 46
5. อภิปรายผลการทดลอง..... 54
   1. การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค differential display 54
   2. การโคลนชิ้นส่วน DNA ที่แตกต่างกัน..... 55
   3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน DNA..... 56
   4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่โคลนได้ด้วย northern blot analysis... 58

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ (ต่อ)

6. สรุปผลการทดลอง..... 63
7. ข้อเสนอแนะ..... 65
รายการอ้างอิง..... 66
ภาคผนวก..... 77
ภาคผนวก ก..... 78
ภาคผนวก ข..... 82
ภาคผนวก ค..... 90
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 92

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนแถบ cDNA ที่แตกต่างกันจากคู่ primer ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนในข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 ที่ปลูกในภาวะต่างๆ ด้วยวิธี differential display	28
2	รูปแบบของแถบ DNA และผลการสังเคราะห์ DNA เพิ่มใหม่อีกครั้ง จาก 108 แถบ cDNA ที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน ที่ได้จากการทำ differential display	32
3	ผลการวิเคราะห์ derived amino acid sequence ของ cDNA โคลน เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสากลของ EMBL databases	36

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1	ขั้นตอนการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค differential display.....	9
2	รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากการทำ differential display โดยใช้คู่ primer Oligo dT8 กับ arbitary primer A16, A17, B13, B14 และ C05.....	29
3	รูปแบบของแถบ DNA ที่พบในการทำ differential display.....	30
4	รูปแบบของแถบ DNA ที่สังเคราะห์เพิ่มปริมาณจาก PCR ใหม่ได้.....	35
5	ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี northern blot analysis เมื่อใช้ OsD1B16-11 เป็น probe	49
6	ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี northern blot analysis เมื่อใช้ OsD1B15-5 เป็น probe.....	50
7	ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี northern blot analysis เมื่อใช้ OsD1B18-18 เป็น probe.....	51
8	ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี northern blot analysis เมื่อใช้ OsD2B15-2 เป็น probe.....	52
9	ตัวอย่างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาขนาดของ DNA marker ใน 6% denaturing DNA polyacrylamide gel.....	88
10	ตัวอย่างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาขนาดของ RNA marker.....	89
11	ลักษณะ RNA ที่มีคุณภาพ.....	91

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย