ผลของไคโตซานที่มีต่อการแสดงออกของยีนในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล'

นางสาวสุภาลัย ไชยสุต

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-6583-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF CHITOSAN ON GENE EXPRESSION IN *Dendrobium* 'EISKUL'

Miss Subhalai Jayasuta

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-17-6583-5

481739

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของไคโตซานที่มีต่อการแสดงออกของยีนในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล'
โดย	นางสาวสุภาลัย ไชยสุต
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันทน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พัชรา ลิมปนะเวช)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. รัฐ พิชญางกูร)

สุภาลัย ไชยสุต : ผลของไคโตซานที่มีต่อการแสดงออกของยีนในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' (EFFECTS OF CHITOSAN ON GENE EXPRESSION IN *Dendrobium* 'EISKUL') อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์ อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล, 107 หน้า. ISBN 974-17-6583-5.

การศึกษาครั้งนี้เป็นการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' ที่ได้รับไคโตซาน และไม่ได้รับไคโตซาน ด้วยวิธี differential display ไคโตซานที่ใช้ในการศึกษาวิจัยอยู่ในรูปโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธีทางเอนไซม์ ซึ่งมี degree of deacetylation เป็น 80% ที่ความเข้มข้น 10 ppm จากการศึกษาการสกัด total RNA ของกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' การปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของ extraction buffer ของ Yu และ Goh (2000) โดยการใช้สาร polyvinylpolypyrrolidone แทนการใช้สาร polyvinylpyrrolidone มีผลช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการสกัด total RNA เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในกล้วยไม้ชนิดนี้ การแยกรูปแบบการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันในใบอ่อนของต้นที่ได้รับไคโตซาน และไม่ได้รับไคโตซาน โดยใช้ oligo dT_{11} NN ไพรเมอร์ จำนวน 8 ไพรเมอร์ ร่วมกับไพรเมอร์แบบสุ่ม จำนวน 9 ไพรเมอร์ พบว่ามี cDNA ที่แสดงความแตกต่างจำนวน 145 แถบ ซึ่งมีเพียง 19 ชิ้น cDNA ที่สามารถโคลน และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ จาก cDNA ดังกล่าวพบว่ามี cDNA จำนวน 11 ชิ้น ที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ และ/หรือลำดับกรดอะมิโน ที่พบในสิ่งมีชีวิตอื่น ในจำนวนนี้มี cDNA จำนวน 5 ชิ้น ที่มีความคล้ายคลึงกับจีโนมของพืชชนิดอื่น ส่วนเมื่อทำการแปลรหัส พบว่าสายโพลีเปปไทด์ที่แปลรหัสจาก cDNA ได้ จำนวน 4 สาย ที่มีความคล้ายคลึงกับสายโพลีเปปไทด์ของแบคทีเรีย และอีก 6 สายมีความคล้ายคลึงกับสายโพลีเปปไทด์ที่พบในพืช จากผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของชิ้นส่วน cDNA หมายเลข *De362* และ *De7696* (ซึ่งหมือนกับ *De164*) ในใบอ่อนที่ได้รับไคโตซาน และไม่ได้รับไคโตซาน โดยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction พบว่าชิ้นส่วน cDNA หมายเลข *De362* ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ cDNA ที่พบในเนื้อเยื่อเจริญของข้าวฟ่าง และชิ้นส่วน cDNA หมายเลข *De7696* ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับยีน *Ycf2* ในคลอโรพลาสต์จีโนม มีการแสดงออกลดลงหลังจากได้รับไคโตซาน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากข้อมูลข้างต้นทำให้ทราบว่าไคโตซานมีผลต่อการแสดงออกของยีนในคลอโรพลาสต์ ซึ่งเป็นรายงานชิ้นแรก ในขณะที่รายงานส่วนใหญ่พบผลของไคโตซานที่มีต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารป้องกันตนเองของพืช

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์.....ลายมือชื่อนิสิต.....สุภาลัย ไชยสุต.....
สาขาวิชา.....พันธุศาสตร์.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....ศุภจิตรา ชัชวาลย์.....
ปีการศึกษา.....2548.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล.....

4572552523 : MAJOR GENETICS

KEY WORDS: *Dendrobium* / Differential display / Gene expression / Chitosan

SUBHALAI JAYASUTA : EFFECTS OF CHITOSAN ON GENE EXPRESSION IN *Dendrobium* 'EISKUL'. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUPACHITRA CHADCHAWAN, Ph,D. THESIS COADVISOR : ASST. PROF. PONGTHARIN LOTRAKUL, Ph,D., 107 pp. ISBN 974-17-6583-5.

Gene expression of chitosan-treated and untreated *Dendrobium* 'EISKUL' was compared by differential display method. The enzymatically prepared oligomer form of chitosan with 80% degree of deacetylation at 10 ppm was used in this research. The substitution of polyvinylpolypyrrolidone to polyvinylpyrrolidone in RNA extraction buffer developed by Yu and Goh (2000) was found to increase the total RNA extraction efficiency of *Dendrobium* 'EISKUL'. A combination of 8 oligo dT_{11} NN primers and 9 arbitrary primers was used to detect the different gene expression patterns in young leaves of the chitosan-treated and -untreated plants. The total of 145 different cDNA bands were detected. Nineteen putative cDNAs which showed the different pattern were cloned and sequenced. Only eleven clones showed the significant homology to other organism 's nucleotide and/or putative amino acid sequences. Five of them showed the homology to genome of other plant species. Four of the putative polypeptides, derived from the cDNA sequences were similar to those of bacteria and six of them were similar to plant polypeptide sequences. *De362* and *De7696* (also similar to *De164*), the cDNA fragments similar to cDNA found in *Sorghum* meristem, and the conserved coding sequence of *Ycf2* gene in chloroplast genome respectively, were detected for reduction of gene expression in young leaves after 24 hours of chitosan treatment, compared to the untreated control by reverse transcription-polymerase chain reaction. This was the first report on the effect of chitosan on chloroplast gene expression whereas almost all previous reports showed the effect of chitosan on the induction of plant defensive genes.

Department .....Botany.....Student's signature..... Subhalai Jayasuta .....

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

Academic year.....2005.....Co-advisor's signature..... Pongtharin Lotrakul

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำต่างๆ ตลอดการทำวิจัย และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ จนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันทน์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พัชรา ลิมปนะเวช และอาจารย์ ดร. รัฐ พิชญางกูร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำต่างๆ ตลอดการวิจัย และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ต่อศักดิ์ สีลานันท์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือทางด้านอุปกรณ์การทำวิจัย และคำแนะนำต่างๆ ตลอดการวิจัย

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์ และกลุ่มวิทยานิพนธ์ เพื่อการตีพิมพ์เผยแพร่ ในระดับบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนการศึกษา และวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณฐปนา บางยี่ขัน และคุณสหัช จันทนาอรพินท์ สำหรับความช่วยเหลือในการทำวิจัย คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ รวมทั้งเป็นกำลังใจ และให้ความห่วงใย

ขอขอบคุณ คุณศักดิ์ชัย กรรมารางกูร คุณมลิวรรณ นาคขุนทด คุณละอออรัตน์ เวชกุล คุณสุดารัตน์ บ่ายเจริญ คุณนวลนภา เจริญรวย คุณปิยวัชช นิติกุล คุณยิ่งยง สันติลัคนา และทุกท่านที่เป็นกำลังใจ และให้คำปรึกษาตลอดการวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณยาย คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัว ที่สนับสนุนในด้านการศึกษา ตลอดจนเป็นกำลังใจ ให้คำปรึกษา และความห่วงใยเสมอมา จนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ฌ
สารบัญรูปภาพ.....ญ
บทที่
1. บทนำ.....1
2. ตรวจเอกสาร.....3
ไคโตซาน.....3
Differential display.....9
3. อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง.....14
พืชทดลอง.....14
สถานที่ปลูกพืชทดลอง.....14
อุปกรณ์การศึกษา.....15
สารเคมี.....18
วิธีการทดลอง.....22
4. ผลการทดลอง.....31
ศึกษาวิธีการสกัด total RNA ที่เหมาะสมสำหรับกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล'..... 31
ศึกษาการแสดงออกของยีน โดยวิธี differential display.....37
โคลนชิ้นส่วน cDNA ที่แตกต่างระหว่างกล้วยไม้ทั้ง 2 ชุดการทดลอง
เข้าในเวกเตอร์ที่เหมาะสม.....40
วิเคราะห์ชนิดของยีนที่มีการตอบสนองต่อไคโตซานในกล้วยไม้
สกุลหวาย 'เอียสกุล'.....43
วิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่คัดเลือกได้จากการทำ differential display.....53

5. อภิปรายผลการทดลอง.....55
ศึกษาวิธีการสกัด total RNA ที่เหมาะสมสำหรับกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล'..... ..55
ศึกษาการแสดงออกของยีน โดยวิธี differential display.....59
โคลนชิ้นส่วน cDNA ที่แตกต่างระหว่างกล้วยไม้ทั้ง 2 ชุดการทดลอง
เข้าในเวกเตอร์ที่เหมาะสม.....61
วิเคราะห์ชนิดของยีนที่มีการตอบสนองต่อไคโตซานในกล้วยไม้
สกุลหวาย 'เอียสกุล'.....62
วิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่คัดเลือกได้จากการทำ differential display.....65
6. สรุปผลการทดลอง.....69
ข้อเสนอแนะ.....71
รายการอ้างอิง.....72
ภาคผนวก.....79
ภาคผนวก ก.....80
ภาคผนวก ข.....84
ภาคผนวก ค.....92
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....107

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 ปริมาณ และมูลค่าการส่งออกดอกกล้วยไม้สดรายเดือนของประเทศไทย.....8
2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จำเพาะ.....28
3 คุณภาพ และปริมาณของ total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อใบอ่อนของกล้วยไม้ น้ำหนัก 0.4 กรัม ที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ เมื่อตรวจสอบโดยวิธี spectrophotometric measurement.....33
4 คุณภาพ และปริมาณของ total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อใบอ่อนของกล้วยไม้ ปริมาณ 0.1 0.2 0.3 และ 0.4 กรัม ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบโดยวิธี spectrophotometric measurement 36
5 คู่ไพรเมอร์ที่ตรวจพบความแตกต่างของแถบ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากกล้วยไม้ สกุลหวาย 'เอียสกุล' ทั้ง 2 ชุดการทดลอง.....37
6 การกำหนดการเรียกคู่ไพรเมอร์.....40
7 แถบ cDNA ที่มีรูปแบบแตกต่างกันจำนวน 67 แถบ ที่คัดเลือกจาก คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด เพื่อทำการโคลน.....41
8 คู่ไพรเมอร์ และชิ้นส่วน cDNA ที่สามารถโคลนได้ในเวกเตอร์ pGEM-T.....42
9 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ที่โคลนได้กับข้อมูล ในฐานข้อมูลสากล GenBank ของ NCBI โดยใช้โปรแกรม bl2seq.....44
10 ผลการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของ cDNA ที่โคลนได้กับข้อมูล ในฐานข้อมูลของ EMBL โดยใช้โปรแกรม Swiss-Prot / TrEMBL.....49

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1	ขั้นตอนการผลิตไคติน-ไคโตซาน ด้วยวิธีทางเคมี	4
2	โครงสร้างของไคติน และไคโตซาน	5
3	หลักการของวิธี differential display	10
4	คุณภาพของ total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อใบอ่อนของกล้วยไม้ น้ำหนัก 0.4 กรัม โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ในตัวกลาง คือ 0.8% agarose gel ใน 1X TBE บัฟเฟอร์ ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที	32
5	คุณภาพของ total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อใบอ่อนของกล้วยไม้ ปริมาณ 0.1 0.2 0.3 และ 0.4 กรัม ตามลำดับ โดยการแยกด้วย กระแสไฟฟ้า ในตัวกลาง คือ 0.8% agarose gel ใน 1X TBE บัฟเฟอร์ ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที	35
6	รูปแบบความแตกต่างของ cDNA ที่ได้จากการศึกษาการแสดงออกของยีน โดยวิธี differential display	39
7	เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนต่างๆ ระหว่างกล้วยไม้สกุลหวาย ชุดควบคุม และชุดที่ได้รับไคโตซาน ที่ศึกษาจากเนื้อเยื่อกล้วยไม้ จำนวน 3 ชุด	54
8	ความแตกต่างของแถบ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากกล้วยไม้สกุลหวาย ชุดควบคุม และชุดที่ได้รับไคโตซาน ระหว่างคู่ไพรเมอร์ต่างๆ ที่แยกด้วย กระแสไฟฟ้า ในตัวกลาง คือ 6% polyacrylamide gel ใน 1X TBE บัฟเฟอร์ ที่กระแสไฟฟ้า 90 โวลต์ เป็นเวลา 7 ชั่วโมง	93
9	ขนาดของแถบ DNA ของ DNA marker ที่แยกด้วยกระแสไฟฟ้า ในตัวกลาง คือ 6% polyacrylamide gel ใน 1X TBE บัฟเฟอร์ ที่กระแสไฟฟ้า 90 โวลต์ เป็นเวลา 7 ชั่วโมง	96