

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่การสร้างต้นข้าวจำลองพันธุ์เพื่อที่จะใช้ในการศึกษาบทบาทของยีนที่โคลนได้จากการทำ EST microarray ของข้าวระยะออกดอกและพัฒนาเป็นเมล็ด โดยเริ่มจากการสร้างชุดยีนในรูปแบบของ sense และ antisense cDNA ด้วยวิธีพีซีอาร์ แล้วนำชุดยีนที่สร้างได้ไปเชื่อมเข้ากับพลาสมิดสำหรับแสดงออกที่ตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *SmaI* และถ่ายโอนไปยังเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA101 ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการถ่ายยีนไปยังจีโนมข้าว ซึ่งจากการวิจัยในช่วงปีแรกพบว่า สามารถสร้างชุดยีนในรูปแบบของ sense และ antisense cDNA ได้และสามารถติดต่อชุดยีนในรูปแบบดังกล่าวไปเชื่อมต่อบนพลาสมิดสำหรับแสดงออกแล้วถ่ายโอนไปยัง *A. tumefaciens* strain EHA101 ได้สำเร็จและในขณะเดียวกันก็ได้สร้างระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวเพื่อรองรับการถ่ายโอนยีนด้วย แต่จากการถ่ายโอนยีนไปยังแคลลัสข้าวพบปัญหาการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียภายหลังจากการถ่ายยีน ดังนั้น จึงได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการถ่ายยีนเข้าไปยังส่วนของเอ็มบริโอที่เพิ่งงอก 2 วันแทนการถ่ายยีนไปยังแคลลัส และจากการศึกษาพบว่า วิธีการดังกล่าวไม่สามารถนำมาทดแทนการถ่ายยีนผ่านแคลลัสได้แม้จะไม่มีปัญหาด้านการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียเพราะไม่พบการสอดแทรกของยีนบนข้าวจำลองพันธุ์ที่ชักนำได้ ทำให้กลับมาใช้แคลลัสข้าวเป็นเป้าหมายในการถ่ายยีนเหมือนเดิม และจากการปรับวิธีการเตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้ออะโกรแบคทีเรียและวิธีการบ่มชิ้นพืชเป้าหมายกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ใช้ในการถ่ายยีนพบว่า สามารถกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียภายหลังจากการถ่ายยีนได้ จึงได้คัดเลือกเซลล์ที่ได้รับยีนบนอาหารคัดเลือกที่มีการเติมยาปฏิชีวนะไฮโกรไมซิน แล้วชักนำให้เซลล์ที่คาดว่าได้รับยีนพัฒนาเป็นต้นและราก ซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 5 เดือน จากนั้นย้ายต้นข้าวจำลองพันธุ์ออกปลูกในกระถางอีกประมาณ 1 เดือนและบันทึกลักษณะฟีโนไทป์ที่แสดงออกและตรวจสอบการสอดแทรกของยีนบนจีโนมข้าว ซึ่งพบว่า ลักษณะฟีโนไทป์ที่แสดงออกของต้นข้าวจำลองพันธุ์แตกต่างไปจากต้นข้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน แต่จากการตรวจสอบการสอดแทรกของยีนด้านทานยาปฏิชีวนะไฮโกรไมซินในต้นข้าวจำลองพันธุ์ที่ได้ด้วยวิธีพีซีอาร์กลับไม่พบการสอดแทรกของยีนจึงไม่สามารถศึกษาผลของยีนดังกล่าวต่อการแสดงออกของลักษณะฟีโนไทป์ได้ ดังนั้น การศึกษาบทบาทหน้าที่ของยีนดังกล่าวโดยอาศัยการสร้างต้นข้าวจำลองพันธุ์อาจต้องเลือกวิธีการถ่ายยีนที่มีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียหรืออาจใช้วิธี reverse genetic โดยการนำเอาลำดับเบสของยีนดังกล่าวไปสืบค้นหาสายพันธุ์ข้าวกลายพันธุ์ในฐานข้อมูลของ rice mutant line เพื่อนำมาศึกษาบทบาทของยีน

คำสำคัญ ข้าวระยะออกดอกและพัฒนาเป็นเมล็ด, EST microarray, การถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย

Abstract

This research aims to establish transgenic rice for functional analysis of gene which cloned by using data of gene expression profile from EST microarray during flowering and grain filling of rice. The sense and antisense of gene were generated by PCR technique and ligated to expression plasmid vector at *Xba*I and *Sma*I sites. The resulted plasmids were further transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA101 as mediators for rice transformation. Plasmids harboring interest gene as designed orientation were successfully constructed and transferred to *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA101 during the first year of research. In addition to the construction of expression plasmid vector harboring sense and antisense of gene, rice tissue culture system supporting gene transformation was also established. After gene transfer to target explant, the eradication of over grown *Agrobacteria* on transformed calli was found to be a main problem. The direct gene transfer to two- day germinated embryos was then considered as alternative method to reduce the problem of over grown *Agrobacteria*. Although the over grown *Agrobacteria* was solved by transferring gene to two- day germinated embryos, but the integration of gene on genome of transgenic rice was not detected. Therefore, calli were still the main target for transformation. The adjustment of *Agrobacteria* cell suspension preparation and co- cultivation were able to reduce the problem of over grown *Agrobacteria* on transformed calli after gene transfer. The transformed calli were then grown on selective medium containing hygromycin as selective agent and regenerated into whole plant. The transformation period from the beginning to regenerated plants was about five months in total. The *in vitro* grown transgenic rice was then transferred to pots for one additional month. The difference of phenotypic expression of transgenic rice when compared to non transformed rice were observed, however, the integration of hygromycin resistant gene was not detected in transgenic lines. It indicated that obtained transgenic rice were unable to use for gene functional analysis. The other effective methods for gene transfer instead of *Agrobacterium* mediated transformation should be considered. Additionally, the reverse genetic approach which searching rice mutant lines against rice mutant database by using sequence of interest gene as query may help to get knockout lines for gene functional analysis.

Key words flowering and grain filling of rice, EST microarray, *Agrobacterium* mediated transformation